



## ร่างรายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การใช้ประโยชน์เซลล์สุลจากขานอ้อยในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์  
สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก”

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประกิต สุขไย

พฤษภาคม 2561

“งานวิจัยยังไม่สมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง”

สัญญาเลขที่ RDG 60T0174

ร่างรายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การใช้ประโยชน์เซลล์โลสจากขานอ้อยในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์  
สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก”

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประกิต สุขไย

พฤษภาคม 2561

“งานวิจัยยังไม่สมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง”

## บทสรุปผู้บริหาร

การใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อยและการสร้างมูลค่าเพิ่ม ต่อยอดเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ เป็นหนึ่งในการรักษาเสถียรภาพของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลของประเทศไทยที่เป็นการพัฒนาอย่างยั่งยืน งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการใช้ประโยชน์จากขานอ้อยที่เป็นของเหลือจากกระบวนการหีบสกัด โดยใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตนาโนเซลลูโลสที่เป็นเส้นใยเสริมแรงให้กับวัสดุต่างๆ รวมทั้งมีคุณสมบัติไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งใช้ส่วนผสมสำคัญในการผลิตโครงร่างเส้นใยเซลลูลาร์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ซึ่งที่เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ใช้ในด้านการแพทย์ เพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ด้านการทดแทนกระดูกและส่งเสริมการสร้างเซลล์กระดูกที่ถูกทำลาย โดยนาโนเซลลูโลสที่มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตร จะสามารถกระจายตัวได้ดีและเป็นเนื้อเดียวกันกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และสามารถส่งเสริมความแข็งแรงของโครงร่างเส้นใยเซลลูลาร์ดังกล่าวได้ และศึกษาการผสมสารส่งเสริมการเจริญของเซลล์กระดูก คือ ไฮดรอกซีแอปาทิต ผสมร่วมกับโครงร่างเส้นใยเซลลูลาร์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และนาโนเซลลูโลส โดยศึกษาคุณสมบัติสำคัญของการเป็นโครงร่างเส้นใย ได้แก่ คุณสมบัติเชิงกล (ความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของโครงร่างเส้นใยเซลลูลาร์) ความเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหรือความเป็นพิษต่อเซลล์ และการส่งเสริมการเจริญของเซลล์กระดูก เพื่อเป็นแนวทางในการต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ต่อไป

ในงานวิจัยนี้ มุ่งเน้นศึกษาการใช้ขานอ้อยเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตนาโนเซลลูโลส โดยอาศัยวิธีระเบิดด้วยไอน้ำ การฟอกสี และการย่อยด้วยกรด ตามลำดับ โดยกระบวนการเตรียมดังกล่าว สามารถเตรียมนาโนเซลลูโลสที่มีขนาดอยู่ในช่วงนาโนเมตร โดยนาโนเซลลูโลสที่เตรียมได้จะมีบทบาทในการใช้เป็นสารเสริมแรงให้กับโครงร่างเส้นใยที่ผลิตจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังศึกษาพัฒนาคุณสมบัติของโครงร่างเส้นใยด้วยการผสมกับอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ซึ่งมีบทบาทในการเป็นสารที่สามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์กระดูก อย่างไรก็ตาม การกระจายตัวของนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตในโครงร่างเส้นใยถือเป็นหัวใจหลักของการเตรียมโครงร่างเส้นใยที่มีคุณภาพดี ดังนั้น งานวิจัยได้ศึกษา โดยออกกระบวนการผสมและขึ้นรูปโครงร่างเส้นใยทั้งหมด 3 วิธี เพื่อหาวิธีที่สามารถทำให้สารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตกระจายตัวได้ดีในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ ใช้ในการวิเคราะห์และศึกษาผลกระทบของสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตต่อโครงร่างเส้นใยที่เตรียมได้ด้วยวิธีการผสมและขึ้นรูปต่าง ๆ

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า วิธีการเตรียมโครงร่างเส้นใยโดยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตโดยตรง (*In situ synthesis*) ในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสก่อนผสมกับสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์สามารถส่งเสริมการกระจายตัวของทั้งนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะเกาะอยู่บริเวณผิวของเส้นใยนาโนเซลลูโลส ทำให้เกิดการกระจายตัวที่ดี ดังนั้น ด้วยเหตุผลดังกล่าว ทำให้เมื่อ

ศึกษาสมบัติทางกลด้วยเครื่องวัดแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ยังช่วยทำให้มีความเป็นรูพรุนเพิ่มขึ้นดังภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์ได้ เป็นสิ่งจำเป็นและเป็นคุณสมบัติสำคัญของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยงานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ผสมนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ตามวิธีมาตรฐาน ISO standard 10993-5:2009 (E) Annex C พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่มีปริมาณนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์มากที่สุด ยังคงแสดงคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ L929 ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญที่สามารถต่อยอดในการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

จากผลการวิจัยดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงบทบาทของชานอ้อยที่สามารถถูกพัฒนาและต่อยอดให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า คือ นาโนเซลลูโลส อีกทั้งยังแสดงถึงการนำนาโนเซลลูโลสไปใช้ในจริง เป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง) ซึ่งเป็นหนึ่งในการรักษาเสถียรภาพของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลของประเทศไทยที่เป็นการพัฒนาอย่างยั่งยืน

## บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อศึกษาการเตรียมโครงเลี้ยงจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ร่วมกับไฮดรอกซีแอพาไทต์และนาโนเซลลูโลสที่สกัดได้จากชานอ้อย จากผลการทดลองพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ถูกศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงไฮดรอกซีแอพาไทต์เกาะอยู่บริเวณนาโนเซลลูโลส นอกจากนี้ ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดยังแสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวที่ดีของทั้งไฮดรอกซีแอพาไทต์และนาโนเซลลูโลสในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ในขณะที่การศึกษาด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี การวิเคราะห์ปริมาณธาตุและการวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์สามารถยืนยันการมีไฮดรอกซีแอพาไทต์และนาโนเซลลูโลสอยู่ในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ ค่าความเป็นรุกรานของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นตามปริมาณของไฮดรอกซีแอพาไทต์และนาโนเซลลูโลสในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ซึ่งเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ ค่าเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงเลี้ยงเซลล์ถูกศึกษาด้วยวิธี MTT assay พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ร้อยละ 83 จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ร่วมกับนาโนเซลลูโลสและไฮดรอกซีแอพาไทต์แสดงถึงศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในวัสดุทางการแพทย์ได้

**คำสำคัญ:** ชานอ้อย, ไฮดรอกซีแอพาไทต์, นาโนเซลลูโลส, โครงเลี้ยงเซลล์

## Abstract

The aim of this work was to study the synthesis of scaffold obtained from polyvinyl alcohol (PVA) incorporated with hydroxyapatite (HA) and nanocellulose isolated from sugarcane bagasse. The morphological analysis of scaffold was determined by Scanning electron microscopy (SEM), which exhibited the HA nanoparticles embedded on surface of nanocellulose. In addition, SEM images of scaffold represented the well-dispersion of HA and nanocellulose in PVA matrix, whereas Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, Energy dispersive spectroscopy (EDS) and X-ray diffraction (XRD) techniques confirmed the presence of HA and nanocellulose in PVA matrix. Moreover, the porosity of scaffold were increased with the increasing of HA and nanocellulose content in PVA matrix that suitable for use as scaffold materials. In addition, cytotoxicity analysis of the scaffold was investigated by MTT assay, which revealed no evidence of cytotoxicity with a cell viability of 83%. It can be concluded that the potential of scaffold from PVA incorporated with nanocellulose and HA for biomedical application.

**Keywords:** Sugarcane bagasse, Hydroxyapatite, Nanocellulose, Scaffold

## สารบัญ

## หน้า

|                                             |     |
|---------------------------------------------|-----|
| บทสรุปผู้บริหาร                             |     |
| บทคัดย่อ                                    |     |
| Abstract                                    |     |
| สารบัญ                                      | ก   |
| สารบัญตาราง                                 | ค   |
| สารบัญภาพ                                   | จ   |
| บทที่ 1 บทนำ                                | 1   |
| บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 4   |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย               | 36  |
| บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล              | 44  |
| บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ         | 79  |
| บรรณานุกรม                                  | บ-1 |

---

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                         | หน้าที่ |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1        | ปริมาณเซลล์โลส เฮมิเซลล์โลส และลิกนินที่พบในวัสดุกลุ่มลิกโนเซลล์โลส                                                     | 6       |
| 2        | ข้อดีและข้อจำกัดของการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลล์โลสด้วยวิธีการต่างๆ                                                     | 11      |
| 3        | การใช้โซเดียมคลอไรด์ในการฟอกขาววัสดุลิกโนเซลล์โลสชนิดต่างๆ                                                              | 16      |
| 4        | ประเภทของนาโนเซลล์โลส                                                                                                   | 17      |
| 5        | การเตรียมนาโนเซลล์โลสโดยการย่อยด้วยกรดจากแหล่งวัตถุดิบต่างๆ                                                             | 21      |
| 6        | องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการสกัดเซลล์โลสในขั้นตอนต่างๆ                                                  | 45      |
| 7        | ปริมาณธาตุ (Element component) ของตัวอย่างนาโนเซลล์โลส                                                                  | 47      |
| 8        | ค่าดัชนีความเป็นผลึกของตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนการสกัด                                                                    | 49      |
| 9        | ความเป็นรูปพรุนและค่าอัตราการพองตัวของโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์<br>นาโนเซลล์โลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ | 54      |
| 10       | ค่าความเป็นรูปพรุนและอัตราการพองตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลล์โลสและไฮ<br>ดรอกซีแอพาไทต์ปริมาณต่างๆ                | 70      |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | หน้าที่ |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1      | ลักษณะเส้นใยเซลลูโลสจากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 4       |
| 2      | การจัดเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสในโครงสร้างส่วนนอก (S1) ส่วนกลาง (S2) และส่วนใน (S3) ในผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) ของชานอ้อยโดยประกอบด้วย เซลลูโลสประมาณ 40% เฮมิเซลลูโลสประมาณ 24% และลิกนินประมาณ 25%                                                                                                         | 5       |
| 3      | ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส และหน่วยย่อย $\beta$ -D-glucopyranose ที่ต่อกันด้วยพันธะ $\beta$ -1,4 glycosidic ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของหน่วยย่อย $\beta$ -D-glucopyranose กับ คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของหน่วยย่อยถัดไป                                                                                                        | 7       |
| 4      | พันธะในโครงสร้างเซลลูโลส (a) พันธะไฮโดรเจนแบบ intramolecular ระหว่างโมเลกุล C2-OH และ C6-OH และ C3-OH (b) พันธะไฮโดรเจนแบบ intermolecular ระหว่าง C3-OH และ C6-OH, และ (c) พันธะแบบ intermolecular ระหว่าง C2-OH, C6-OH และ C3-OH ระหว่างสายเซลลูโลส                                                                          | 8       |
| 5      | ภาพจากวิธีการ AFM (ภาพซ้าย) เพื่อยืนยันว่าเส้นใยเซลลูโลสประกอบด้วยสองส่วนคือส่วนที่เป็นผลึกและส่วนที่เป็นอสัณฐาน                                                                                                                                                                                                              | 8       |
| 6      | กระบวนการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบเซลลูโลส I, เซลลูโลส II, เซลลูโลส III และเซลลูโลส IV                                                                                                                                                                                                                                             | 9       |
| 7      | แบบจำลองลิแกนด์เซลลูโลสและการปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของลิแกนด์เซลลูโลส                                                                                                                                                                                                                          | 10      |
| 8      | ภาพถ่ายนาโนเซลลูโลสจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM); (a) microfibrillated cellulose (MFC), (b) nanocrystalline cellulose (NCC) และ (c) bacterial cellulose (BC)                                                                                                                                                   | 18      |
| 9      | การสังเคราะห์เซลลูโลสโดยแบคทีเรียและโครงสร้างเซลลูโลสในพืช; (ด้านบน) ภาพถ่ายนาโนเซลลูโลสจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ของ cellulose nanocrystals (CNC), micro/nanofibrillated cellulose (MFC และ NFC); (ด้านล่าง) ภาพถ่ายนาโนเซลลูโลสจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของ bacterial cellulose (BC) | 19      |
| 10     | แผนผังการคัดแยก CNF และ CNC โดยวิธีทางกลและวิธีทางเคมีตามลำดับ                                                                                                                                                                                                                                                                | 20      |
| 11     | โครงสร้างของ CNC หลังจากการย่อยด้วยกรด                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 21      |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | หน้าที่ |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 12     | เครื่องไมโครฟลูอิดิเซอร์ microfluidizer (M-110EH 30) และ Z-chamber                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 24      |
| 13     | ส่วนประกอบของเครื่องไมโครฟลูอิดิเซอร์ (microfluidizer) ในกระบวนการโฮโมจีไนเซชันแรงดันสูง (microfluidics, U.S.A.)                                                                                                                                                                                                                                                                       | 25      |
| 14     | ภาพถ่ายเส้นใยเซลลูโลสจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM); (a) เส้นใยที่ผ่านโฮโมจีไนเซอร์ 1 รอบ (b) เส้นใยที่ผ่านโฮโมจีไนเซอร์ 2 รอบ (c) เส้นใยที่ผ่านโฮโมจีไนเซอร์ 5 รอบ (d) เส้นใยที่ผ่านโฮโมจีไนเซอร์ 10 รอบ (e) เส้นใยที่ผ่านโฮโมจีไนเซอร์ 15 รอบ และ (f) เส้นใยที่ผ่านโฮโมจีไนเซอร์ 20 รอบ                                                                                | 26      |
| 15     | ขนาดของนาโนเซลลูโลสที่ (a) ความดันและ (b) จำนวนรอบ ที่แตกต่างกัน และ (c) นาโนเซลลูโลสที่เตรียมได้ที่ 80 MPa จำนวน 30 รอบ                                                                                                                                                                                                                                                               | 27      |
| 16     | ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ (a) ยางธรรมชาติ (natural rubber) (b) ยางธรรมชาติ/เซลลูโลสวิสเกอร์นาโนคอมโพสิตที่ประกอบด้วยเซลลูโลสวิสเกอร์จากขานอ้อยร้อยละ 10                                                                                                                                                                                                             | 28      |
| 17     | (I) ลิ้นหัวใจเทียม นาโนเซลลูโลส-พอลิยูรีเทน (a) ลิ้นหัวใจเทียมที่ฝังอยู่กับเนื้อเยื่อ (b) ลิ้นหัวใจ (c) แสดงผิวหน้าไหลเข้า (d) แสดงผิวหน้าไหลออก (II) หลอดเลือดเทียมที่ทำจากนาโนเซลลูโลส-พอลิยูรีเทนที่วางอยู่ระหว่างแขนงบราคิโอเซฟาλικทังก์ (brachiocephalic trunk) และหลอดเลือดแดงคาโรติด (carotid artery) ในผู้ป่วยเพศชายอายุ 26 ปีที่เป็นโรค multiple endocrine neoplasia (MEN 2B) | 29      |
| 18     | การเตรียมโครงร่างเส้นใยเซลล์ด้วยเทคนิคของไหลเหนือจุดวิกฤติ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 32      |
| 19     | การเตรียมโครงร่างเส้นใยเซลล์ด้วยวิธี electrospinning                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 33      |
| 20     | การเตรียมโครงร่างเส้นใยเซลล์ด้วยเทคนิคการแยกเฟส                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 34      |
| 21     | การเตรียมโครงร่างเส้นใยเซลล์ด้วยเทคนิคการใช้สารสร้างรูพรุน                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 35      |
| 22     | การเตรียมโครงร่างเส้นใยเซลล์ด้วยวิธีการแยกเฟสและการทำแห้งแบบ emulsion freeze-drying                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 35      |
| 23     | แผนภาพสรุปการออกแบบกระบวนการผสมและขึ้นรูปโครงร่างเส้นใยเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ นาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทาइट                                                                                                                                                                                                                                                            | 38      |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | หน้าที่ |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 24     | การแช่พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลส ในสารแขวนลอยอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 39      |
| 25     | การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์แบบ In situ synthesis                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 40      |
| 26     | การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์แบบ In situ synthesis                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 41      |
| 27     | ลักษณะตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของชานอ้อยที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัด (a), เส้นใยชานอ้อยที่ผ่านกระบวนการเปิดด้วยไอน้ำ (b), เส้นใยชานอ้อยที่ผ่านกระบวนการเปิดด้วยไอน้ำและฟอกขาว (c) และลักษณะของตัวอย่างเส้นใยนาโนเซลลูโลสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแรงอะตอม (d)                                                                                                         | 46      |
| 28     | ลักษณะเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างนาโนเซลลูโลสจากเครื่อง EDX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 47      |
| 29     | แสดงเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างชานอ้อยที่ผ่านการสกัด (SCB), ตัวอย่างที่ผ่านการฟอกขาว (BF) และตัวอย่างเส้นใยนาโนเซลลูโลส (CNC)                                                                                                                                                                                                                                                                      | 48      |
| 30     | ลักษณะรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนการสกัด                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 49      |
| 31     | แสดงลักษณะของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(6a-b) และผล EDS ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (6c-d)                                                                                                                                                                                                                                                          | 51      |
| 32     | แสดงเส้นสเปกตรัมของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 51      |
| 33     | ลักษณะรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 52      |
| 34     | ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ต่างๆ (กำหนดให้ a คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลส, b คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 0.5, c คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 1 และ d คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 3) | 53      |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | หน้าที่ |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 35     | แสดงเส้นสเปกตรัมของโครงเลี้ยงเซลล์ (กำหนดให้ (a) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลส, (b) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 0.5, (c) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 1, (d) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 3 และ (e) คือ อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์)                                                                            | 56      |
| 36     | ลักษณะรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ต่าง ๆ (กำหนดให้ (a) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลส, (b) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 0.5, (c) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 1, (d) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 3 และ (e) คือ อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์) | 57      |
| 37     | กราฟแสดงค่า Compressive stress-strain ของ PC (a), PCH0.5% (b), PCH1% (c), PCH3% (d)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 58      |
| 38     | แสดงค่า Compressive modulus ของโครงเลี้ยงเซลล์ ที่ผสมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 0.5-3 โดยน้ำหนัก                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 59      |
| 39     | ลักษณะของเซลล์ทดสอบ L929 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ภายหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (a) ชุดการทดลองควบคุมแบบลบ, (c) โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีและมีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก, (e) ชุดการทดลองควบคุมแบบบวก ในขณะที่ (b) ชุดการทดลองควบคุมแบบลบ, (d) โครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีและมีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก, (f) ชุดการทดลองควบคุมแบบบวก หลังจากการวิเคราะห์ด้วย MTT assay                                                        | 61      |
| 40     | ค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีและมีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 0.5-3 โดยน้ำหนัก (เส้นสีแดง คือ ค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตร้อยละ 70)                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 62      |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | หน้าที่ |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 41     | ลักษณะของเส้นใยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตเกาะอยู่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า (a) และ 30,000 เท่า (b) กราฟแสดงปริมาณองค์ประกอบของธาตุต่างๆในตัวอย่างสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต (c) และสัดส่วนของปริมาณธาตุในตัวอย่าง (d) | 64      |
| 42     | เส้นสเปกตรัมของตัวอย่างสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส (CNCs) อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต (HA) และสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต (HC)                                                                                                                                                         | 66      |
| 43     | ลักษณะการเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส (CNCs) อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต (HA) และสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต (HC)                                                                                                                                               | 67      |
| 44     | ลักษณะภาพตัดขวางภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและไฮดรอกซีแอปาทิตปริมาณต่าง ๆ กำหนดให้ PVA (a), PHC-2 (b), PHC-4 (c), PHC-6 (d), PHC-8 (e), PHC-10 (f) and PHC-12 (g)                                                                              | 69      |
| 45     | ลักษณะเส้นสเปกตรัม FTIR ในช่วง 4000 – 500 cm <sup>-1</sup> ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและไฮดรอกซีแอปาทิตปริมาณต่าง ๆ กำหนดให้ HC (a), PVA (b), PHC-2 (c), PHC-4 (d), PHC-6 (e), PHC-8 (f), PHC-10 (g) and PHC-12 (h)                                                                     | 72      |
| 46     | ลักษณะเส้นสเปกตรัม FTIR ในช่วง 1100 – 500 cm <sup>-1</sup> ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและไฮดรอกซีแอปาทิตปริมาณต่าง ๆ กำหนดให้ HC (a), PVA (b), PHC-2 (c), PHC-4 (d), PHC-6 (e), PHC-8 (f), PHC-10 (g) and PHC-12 (h)                                                                     | 72      |
| 47     | ลักษณะของการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและไฮดรอกซีแอปาทิตปริมาณต่าง ๆ กำหนดให้ HC (a), PVA (b), PHC-2 (c), PHC-4 (d), PHC-6 (e), PHC-8 (f), PHC-10 (g) and PHC-12 (h)                                                                                                 | 74      |
| 48     | ค่าทดสอบแรงกด (Compressive modulus) ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต                                                                                                                                                   | 75      |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | หน้าที่ |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 49     | ลักษณะเซลล์ทดสอบ L929 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ที่กำลังขยาย 100 เท่า) โดยกำหนดให้ (a) ชุดการทดลองควบคุมเชิงลบ (c) โครงเลี้ยงเซลล์ PHC-12 และ (e) ชุดการทดลองควบคุมเชิงบวก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และกำหนดให้ (b) กำหนดให้ (b) ชุดการทดลองควบคุมเชิงลบ (d) โครงเลี้ยงเซลล์ PHC-12 (d) และชุดการทดลองควบคุมเชิงบวก (f) หลังจากผ่านกระบวนการ MTT assay | 77      |
| 50     | ค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลล์ูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก (เส้นสีแดง คือ ค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตร้อยละ 70)                                                                                                                                                                                  | 78      |

---

## บทที่ 1

## บทนำ

## 1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยปีละกว่า 100,000 ล้านบาท ซึ่งมีความสำคัญกับเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก โดยปริมาณผลผลิตอ้อยของประเทศไทยมากกว่า 100 ล้านตันในปี 2558/2559 ปัจจุบันภาครัฐ ได้จัดทำนโยบายเพื่อส่งเสริมการเกษตรกรรมเกี่ยวกับอ้อย เช่น ส่งเสริมการปลูกอ้อยในพื้นที่ทำนาที่ไม่เหมาะสม พัฒนาพันธุ์อ้อย รวมไปถึงพยายามศึกษาและปรับปรุงกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบในโรงงาน เพื่อให้สามารถผลิตน้ำตาลทรายดิบจากอ้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ทั้งนี้การส่งเสริมในด้านต่างๆเกี่ยวกับอ้อยนั้นส่งผลให้ปริมาณของเหลือทิ้งจากโรงงานน้ำตาลทั้งประเทศเพิ่มสูงขึ้น เช่น กากน้ำตาล (molasses) กากตะกอน (filter cake) และชานอ้อย (sugarcane bagasse) เป็นต้น โดยในข้อเสนอโครงการนี้ให้ความสำคัญกับชานอ้อยเนื่องจากในกระบวนการผลิตอ้อย 1 ตัน สามารถผลิตน้ำตาลได้ 100-120 กิโลกรัม และได้ชานอ้อยเป็นผลพลอยได้ ประมาณ 370 กิโลกรัม ดังนั้นหากมีผลผลิตอ้อยปีละ 100 ล้านตัน จะมีกากอ้อยปีละ 37 ล้านตัน โดยปกติชานอ้อยจะถูกนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับหม้อต้มไอน้ำเพื่อผลิตพลังงานไอน้ำใช้ในกระบวนการผลิตน้ำตาลหรือผลิตกระแสไฟฟ้าเพื่อใช้ในโรงงานและขายให้แก่ภาครัฐ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากชานอ้อยเพื่อเพิ่มมูลค่าของชานอ้อยในหลากหลายประเภท เช่น ผลิตปาร์ติเกิลบอร์ด ผลิตเอทานอล ผลิตเยื่อกระดาษ เป็นต้น จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของชานอ้อย พบว่า ประกอบด้วยเซลลูโลส ประมาณร้อยละ 30-50 (ปริมาณเซลลูโลสขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของอ้อย และวิธีการสกัด) ดังนั้นชานอ้อยจึงเป็นแหล่งของเซลลูโลสที่มีปริมาณมาก หาได้ง่าย และราคาถูกที่น่าสนใจแหล่งหนึ่ง จากเหตุผลดังกล่าว ส่งผลให้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์เซลลูโลสจากชานอ้อยในหลากหลายมิติเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะเซลลูโลส (cellulose) ที่สกัดแยกได้จากชานอ้อย หน่วยย่อยของเซลลูโลสคือน้ำตาลกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 ไกลโคซิดิก (glycosidic linkages) ต่อกันเป็นสายตรง (linear homopolysaccharides) โดยแต่ละสายของเซลลูโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl groups) จากลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส ส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี เช่น มีความแข็งแรงสูง มีความยืดหยุ่นสูง (Moon *et al.*, 2011) นอกจากนี้สายโมเลกุลของเซลลูโลสจะมีหมู่ไฮดรอกซิลที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบอื่นได้ง่าย ส่งผลให้สามารถสร้างอนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivatives) ต่างๆได้ และสามารถประยุกต์ใช้เซลลูโลสได้หลากหลาย เช่น ตัวดูดซับและปลดปล่อยยา สารตัวเติมในพอลิเมอร์เพื่อเพิ่มความแข็งแรงและยืดหยุ่น เมมเบรนนำไฟฟ้า สารทดแทนไขมันในผลิตภัณฑ์อาหาร สารให้ความคงตัวในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เป็นต้น

ดังนั้น จากการทดลองที่ผ่านมาได้ทำการศึกษาการใช้เซลลูโลสที่มีขนาดในช่วงนาโนเมตร (nanocellulose) ร่วมกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol: PVA) ผลิต

เป็นโครงร่างเลี้ยงเซลล์ (scaffold) สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของ ขานอ้อยอีกวิธีหนึ่ง และเป็นการใช้ประโยชน์ที่สำคัญของเซลล์ลูโลสในอุตสาหกรรมชีวการแพทย์ (biomedicine) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้สนใจและประสงค์จะดำเนินการต่อเพื่อศึกษาเชิงลึกของการผลิตโครงร่างเลี้ยงเซลล์ คือ การใช้โครงร่างเลี้ยงเซลล์เพื่อทดแทนกระดูกและส่งเสริมการสร้างเซลล์กระดูกที่ถูกทำลาย โดยในการศึกษาวัสดุที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือกลุ่มที่เป็นเซรามิกส์ชีวภาพ (Bioceramics) เช่น ไตรแคลเซียม ฟอสเฟต (TCP) และ ไฮดรอกซีแอพาไทต์ (Hydroxyapatite; อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ) เป็นต้น ซึ่งไฮดรอกซีแอพาไทต์ (อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ) เป็นสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตที่นิยมนำมาใช้ เพื่อการปลูกเซลล์กระดูกเนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดกระดูกใหม่ นอกจากนี้ยังเป็น สารอนินทรีย์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิต และสามารถเตรียมได้ง่ายโดยปฏิกิริยาเคมี ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเป็นการต่อยอดจากงานวิจัยที่ได้ดำเนินการมาแล้ว คือ การศึกษาการใช้นาโนเซลล์ลูโลสจากขานอ้อยเพื่อใช้เตรียมโครงร่างเลี้ยงเซลล์ร่วมกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) โดยใช้ไฮดรอกซีแอพาไทต์ (อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ) เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์กระดูก โดยศึกษาลักษณะทางกายภาพของโครงร่างเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ พร้อมทั้งศึกษาลักษณะทางกายภาพของโครงร่างเลี้ยงเซลล์ และทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างโครงร่างเลี้ยงเซลล์ของนาโนเซลล์ลูโลสจากขานอ้อยกับเซลล์กระดูกเพื่อประยุกต์ใช้ในทาง การแพทย์ต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาการเตรียมและคุณสมบัติของนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ที่เตรียมได้

1.2.2 ศึกษาการเตรียมโครงร่างเลี้ยงเซลล์ ระหว่างไฮดรอกซีแอพาไทต์และพอลิไวนิลแอลกอฮอล์โดยใช้ นาโนเซลล์ลูโลสจากขานอ้อยเป็นสารเสริมแรง และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ รวมทั้งการเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงร่างเลี้ยงเซลล์

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 เตรียมและคุณสมบัติของนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์

1.3.2 เตรียมโครงร่างเลี้ยงเซลล์ ระหว่างไฮดรอกซีแอพาไทต์และพอลิไวนิลแอลกอฮอล์โดยใช้นาโน เซลล์ลูโลสจากขานอ้อยเป็นสารเสริมแรง

1.3.3 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ รวมทั้งการเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงร่างเลี้ยงเซลล์

## 1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 โรงงานน้ำตาลได้ทราบถึงการใช้ประโยชน์ขานอ้อยในรูปแบบเซลล์ลูโลสที่มีขนาดระดับนาโน เมตร เป็นการแสดงให้เห็นถึงการใช้ประโยชน์ของขานอ้อยอีกวิธีหนึ่งที่มีมูลค่าสูงขึ้น โดยเฉพาะการ ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการแพทย์

1.4.2 ทราบถึงศักยภาพของการใช้ประโยชน์การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์เชิงร่วมของไฮดรอกซีแอพาไทต์กับวัสดุสังเคราะห์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์โดยใช้ นาโนเซลลูโลสจากชานอ้อยเป็นสารเสริมแรง

1.4.3 เป็นต้นแบบให้กับอุตสาหกรรมอื่นๆที่มีวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้ทราบถึงการใช้ประโยชน์ของเซลลูโลสที่สามารถสกัดได้จากวัสดุดังกล่าวในแง่มุมที่หลากหลายและทำให้โรงงานน้ำตาลได้ตระหนักถึงความสำคัญของงานวิจัยและพัฒนามากขึ้น

---

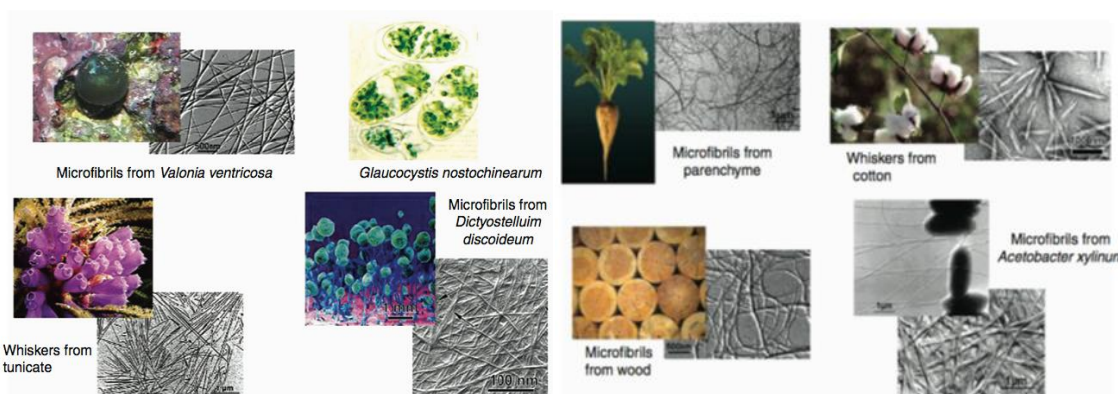
## บทที่ 2

## ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 1. เซลลูโลส (Cellulose)

## 1.1 แหล่งของเซลลูโลส (Sources of cellulose)

เซลลูโลส เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุด ประมาณร้อยละ 45 ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช และสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ในพืชชั้นสูงทุกชนิด (Fan *et al.*, 1987) นอกจากเซลลูโลสจะอยู่ในรูปของส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืช เซลลูโลสยังพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในสัตว์บางชนิด (invertebrates) สัตว์ทะเลหลายชนิด (tunicate) สาหร่าย (*Glaucozystis nostochinearum*) ฟังไจหลายชนิด รวมทั้งพบได้จากแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพที่ 1



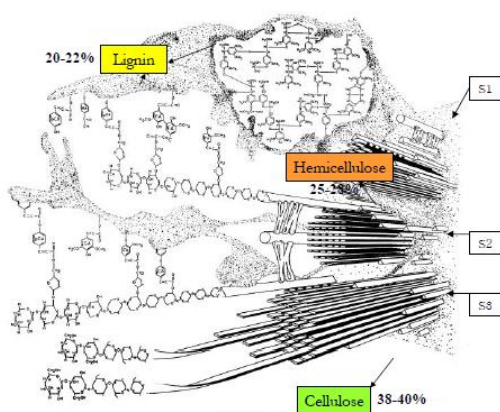
ภาพที่ 1 ลักษณะเส้นใยเซลลูโลสจากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ

ที่มา: Pérez and Samain (2010)

พืชในธรรมชาติโดยทั่วไป ส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ คือ เซลลูโลส (cellulose) โดยโครงข่ายของผนังเซลล์พืชจะประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) รวมเรียกว่า ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) (Yu *et al.*, 2005; Zuluaga *et al.*, 2009) และอาจจะมีสารประเภทอื่นประกอบแทรกอยู่ด้วย เช่น ไคติน (chitin) แมนแนน (mannan) โดยส่วนประกอบที่กล่าวมาจะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่น ไม้เนื้อแข็ง (hardwoods) ไม้เนื้ออ่อน (softwood) และของเหลือทิ้งทางการเกษตร (agricultural residues) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับโครงสร้างผนังเซลล์ ทั้งผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell wall) และ ผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) อายุ และแหล่งของพืชนั้นๆ ในธรรมชาติ (Chundawat *et al.*, 2011) ตัวอย่างเช่น เซลลูโลสในโครงสร้างผนังเซลล์

ปฐมภูมิ (primary cell wall) ประกอบด้วยกลูโคสยาวประมาณ 2,000 โมเลกุล และไม่ต่ำกว่า 14,000 โมเลกุลในโครงสร้างผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) โดยโมเลกุลของเซลลูโลสจะเกาะกันเป็นคู่ตามยาวและเรียงขนานกันเป็นกลุ่ม 40 คู่ เรียกว่าไมโครไฟบริล (microfibril) เพื่อให้ความแข็งแรงกับผนังเซลล์ของพืช (Fan *et al.*, 1987)

ภาพที่ 2 แสดงองค์ประกอบหลักของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสในชั้นโครงสร้างผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) ของขานอ้อยซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณร้อยละ 40 เฮมิเซลลูโลสประมาณร้อยละ 24 และลิกนินประมาณร้อยละ 25 โดยผนังเซลล์ชั้นทุติยภูมิ ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนนอก (S1) ส่วนกลาง (S2) และส่วนใน (S3) ซึ่งโมเลกุลของเซลลูโลสในเนื้อเยื่อชั้น S1 และ S3 มีส่วนที่มีความเป็นระเบียบน้อยกว่า เรียกว่า ส่วนอสัณฐาน (amorphous cellulose) และมีเฮมิเซลลูโลสในปริมาณมาก ส่วนชั้นเนื้อเยื่อ S2 โมเลกุลของเซลลูโลสจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ เรียกว่า ส่วนโครงสร้างผลึก (crystalline cellulose) (Bidlack *et al.*, 1992)



**ภาพที่ 2** การจัดเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสในโครงสร้างส่วนนอก (S1) ส่วนกลาง (S2) และส่วนใน (S3) ในผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) ของขานอ้อยโดยประกอบด้วย เซลลูโลสประมาณ 40% เฮมิเซลลูโลสประมาณ 24% และลิกนินประมาณ 25%

ที่มา: Lee (2005)

ตารางที่ 1 แสดงวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นแหล่งที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น กระดาษมีเซลลูโลส 85-99% ในขณะที่ใบไม้มีเฮมิเซลลูโลส 80-85% และเปลือกถั่วมีลิกนิน 30-40% เป็นต้น

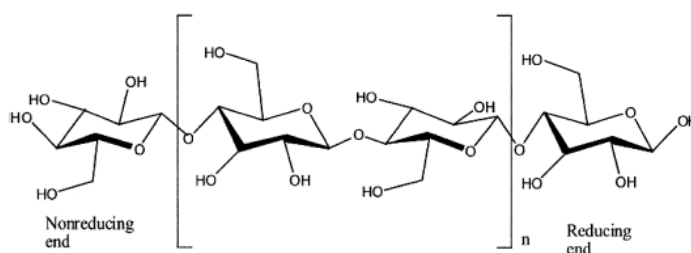
ตารางที่ 1 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่พบในวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลส

| วัสดุลิกโนเซลลูโลส                   | เซลลูโลส (%) | เฮมิเซลลูโลส (%) | ลิกนิน (%) |
|--------------------------------------|--------------|------------------|------------|
| เส้นใยข้าวโพด (Corn fiber)           | 15           | 35               | 8          |
| ซังข้าวโพด (Corn cobs)               | 45           | 35               | 15         |
| ต้นข้าวโพด (Corn stover)             | 40           | 25               | 17         |
| ฟางข้าว (Rice straw)                 | 35           | 25               | 12         |
| ฟางข้าวสาลี (Wheat straw)            | 30           | 50               | 15         |
| ชานอ้อย (Sugarcane bagasse)          | 40           | 24               | 25         |
| หญ้าสวิตช์ (Switchgrass)             | 45           | 30               | 12         |
| หญ้ามะพร้าว (Coastal Bermuda grass ) | 25           | 35               | 6          |
| ไม้เนื้อแข็ง (Hardwoods stems)       | 40-45        | 24-40            | 18-25      |
| ไม้เนื้ออ่อน (Softwood stems)        | 45-50        | 25-35            | 25-35      |
| เปลือกถั่ว (Nut shells)              | 25-30        | 25-30            | 30-40      |
| หญ้า (Grasses)                       | 25-40        | 35-50            | 10-30      |
| กระดาษ (Paper)                       | 85-99        | 0                | 0-15       |
| ใบไม้ (Leaves)                       | 15-20        | 80-85            | 0          |
| ใยเมล็ดฝ้าย (Cotton seed hairs)      | 80-95        | 5-20             | 0          |

ที่มา: Saha (2003); Sun and Cheng (2002)

## 1.2 โครงสร้างของเซลลูโลส (Structural of cellulose)

ด้านโครงสร้างทางเคมี เซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharides) ที่มีโครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วยหน่วยเบตา-D-กลูโคไพราโนส ( $\beta$ -D-glucopyranose Unit) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบตา (1,4) ( $\beta$ -1,4-glycosidic linkage) (Klemm *et al.*, 2005) โดยคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของกลูโคสโมเลกุลแรกเชื่อมต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของกลูโคสถัดไป ดังแสดงในภาพที่ 3 มีสูตรเคมีทั่วไป คือ  $(C_6H_{10n+2}O_{5n+1})_n$  เมื่อ  $n$  คือ จำนวนของหน่วยกลูโคสต่อโมเลกุลของเซลลูโลส (degree of polymerization, DP) (Liu and Sun, 2010)

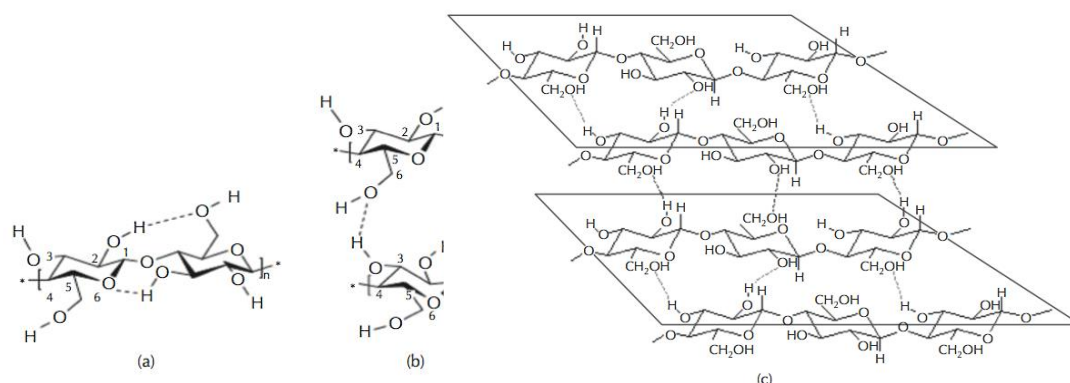


**ภาพที่ 3** ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส และหน่วยย่อย  $\beta$ -D-glucopyranose ที่ต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 glycosidic ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของหน่วยย่อย  $\beta$ -D-glucopyranose กับ คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของหน่วยย่อยถัดไป

ที่มา: Zhang and Lynd (2004)

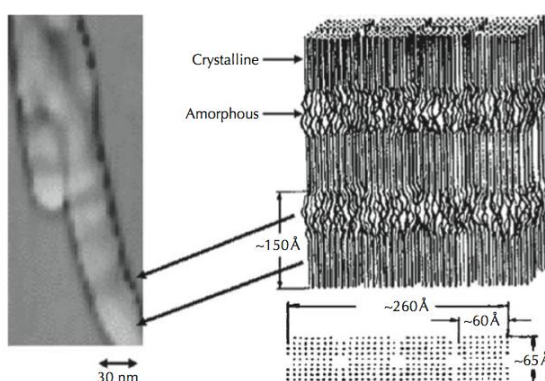
ในโครงสร้างของสายเซลลูโลสจะมีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ที่มีขั้วแตกต่างกัน ได้แก่ -OH ที่ C-2, -OH ที่ C-3 (secondary hydroxyl groups) และ -OH ที่ C-6 (primary hydroxyl group) โดยหมู่ไฮดรอกซิลดังกล่าวจะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนเป็นแบบ intermolecular และ intramolecular (Abdul Khalil *et al.*, 2012) สานกันเป็นร่างแหของเซลลูโลสโดยแสดงดังภาพที่ 4

เมื่อพิจารณาโครงสร้างโดยละเอียดของเซลลูโลส พบว่าเซลลูโลสประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นระเบียบหรือบริเวณที่เป็นผลึก (crystalline) และส่วนที่ไม่เป็นระเบียบหรือส่วนอสัณฐาน (amorphous) ส่วนที่เป็นระเบียบเกิดจากการที่โมเลกุลของกลูโคสมีการเชื่อมกันอย่างเป็นระเบียบ ดังแสดงในภาพที่ 5 และส่วนที่ไม่เป็นระเบียบเกิดจากการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสอย่างไม่เป็นระเบียบ โดยพบว่าเซลลูโลสมีส่วนโครงสร้างที่เป็นระเบียบหรือส่วนที่เป็นผลึกนั้นมากกว่าส่วนอสัณฐาน (Zykwinska *et al.*, 2005)



ภาพที่ 4 พันธะในโครงสร้างเซลลูโลส (a) พันธะไฮโดรเจนแบบ intramolecular ระหว่างโมเลกุล C2-OH และ C6-OH และ C3-OH (b) พันธะไฮโดรเจนแบบ intermolecular ระหว่าง C3-OH และ C6-OH, และ (c) พันธะแบบ intermolecular ระหว่าง C2-OH, C6-OH และ C3-OH ระหว่างสายเซลลูโลส

ที่มา: Liu and Sun (2010)

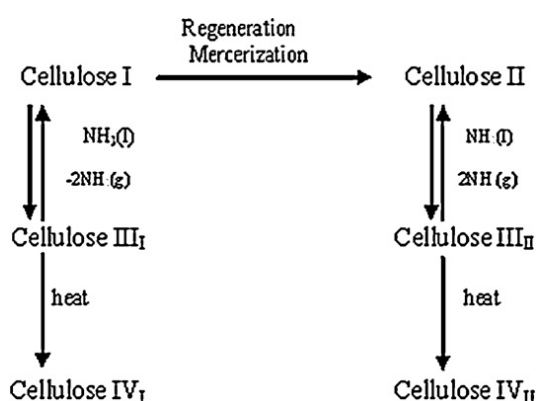


ภาพที่ 5 ภาพจากวิธีการ AFM (ภาพซ้าย) เพื่อยืนยันว่าเส้นใยเซลลูโลสประกอบด้วยสองส่วนคือส่วนที่เป็นผลึกและส่วนที่เป็นอสัณฐาน

ที่มา: Bhattacharya *et al.* (2008)

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาโดยวิธี X-ray diffraction (XRD) และ  $^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance ( $^{13}\text{C}$ -NMR) ของเซลลูโลส พบว่าผลึกเซลลูโลสมีโครงสร้างผลึก 4 แบบ โดยเรียกเป็น เซลลูโลส I, II, III และ IV โดยเซลลูโลส I เป็นรูปผลึกของวัสดุเซลลูโลสดั้งเดิม (native cellulose) พบในธรรมชาติมากที่สุด พบได้ทั้งในสาหร่าย แบคทีเรีย สัตว์บางชนิดและพบมากในพืชชั้นสูง (Hayashi *et al.*, 1987) ยิ่งไปกว่า

นั้น เซลลูโลส I ยังพบได้เป็น 2 รูปแบบ ได้แก่  $\alpha$  และ  $\beta$  โดยความแตกต่างของเซลลูโลส  $\alpha$  และ เซลลูโลส  $\beta$  ก็คือ เซลลูโลส  $\alpha$  จะมีโครงสร้างเป็น triclinic unit cells ส่วนเซลลูโลส  $\beta$  จะมีโครงสร้างเป็น monoclinic unit cells (Sugiyama *et al.*, 1991a) เซลลูโลส  $\beta$  จะมีคุณสมบัติกึ่งเสถียร (metastable) ในส่วนของเซลลูโลส  $\alpha$  จะมีความเสถียรมากกว่า (Sugiyama *et al.*, 1991b) เซลลูโลส  $\alpha$  เป็นรูปแบบที่หายาก มีรายงานที่มีอยู่ในธรรมชาติพบในสาหร่ายสีเขียวบางชนิดเท่านั้น ในขณะที่ เซลลูโลส  $\beta$  พบหลักๆ ในพืชชั้นสูง เช่น ฟางและไม้ เป็นต้น นอกจากนี้ยังทราบว่า เซลลูโลส  $\alpha$  สามารถเปลี่ยนอย่างถาวรให้มีความเสถียรมากขึ้นโดยให้ความร้อนกับเซลลูโลส  $\beta$  (Atalla and Vanderhart, 1984; Sugiyama *et al.*, 1991b; Yamamoto and Horii, 1993; Yamamoto *et al.*, 1989) เซลลูโลส II ซึ่งพบได้ยากมากในธรรมชาติ แต่สามารถเตรียมได้จากเซลลูโลส I โดยการรีเจนเนอเรชัน (regeneration) และเมอร์เซอร์เซชัน (Mercerization) กระบวนการรีเจนเนอเรชันเกี่ยวข้องกับการสลายตัวของเซลลูโลสในตัวทำละลายที่เฉพาะเจาะจง (เช่น N-methylmorpholine-N-oxide) ในขณะที่กระบวนการเมอร์เซอร์เซชัน เซลลูโลสจะต้องแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่านั้นเพื่อให้เกิดการบวม (swollen) (Bessueille and Bulone, 2008) เซลลูโลส  $III_1$  และ เซลลูโลส  $III_{11}$  (Marrinan and Mann, 1956) เตรียมได้จากการเปลี่ยนรูปแบบผันกลับได้ของ เซลลูโลส I และเซลลูโลส II ตามลำดับโดยลิควิด แอมโมเนีย (liquid ammonia) หรือสารพวกเอมีนบางชนิด (amines) และตามด้วยการระเหยของแอมโมเนียส่วนเกิน (Davis *et al.*, 1943; Sarko *et al.*, 1976) ส่วนเซลลูโลส  $IV_1$  and  $IV_{11}$  อาจเตรียมโดยการให้ความร้อนกับ เซลลูโลส  $III_1$  และเซลลูโลส  $III_{11}$  ถึง 206 องศาเซลเซียส ในกลีเซอรอล (Gardiner and Sarko, 1985) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 กระบวนการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบเซลลูโลส I, เซลลูโลส II, เซลลูโลส III และเซลลูโลส IV

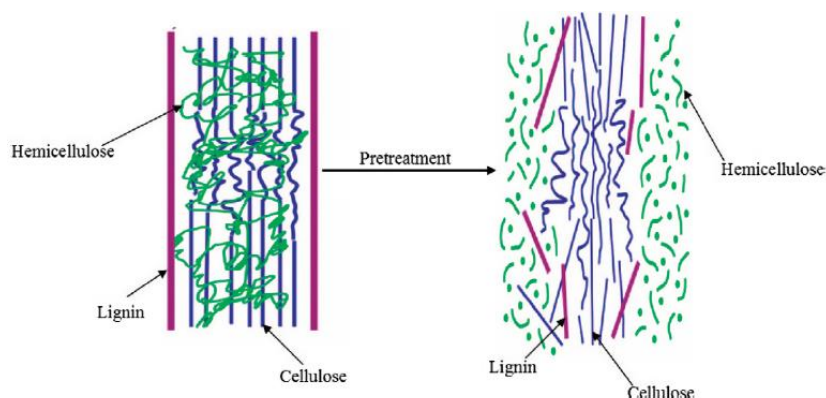
ที่มา: Abdul Khalil *et al.* (2012)

## 2. การสกัดเซลลูโลส (Cellulose Extraction)

กระบวนการสกัดเซลลูโลสจะแตกต่างกันไปตามชนิดและแหล่งวัตถุดิบที่ใช้เตรียมโดยจะอาศัยกระบวนการสกัดหลายขั้นตอน การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกระบวนการต่างๆเป็นวิธีที่จำเป็นในกระบวนการสกัดเซลลูโลส เพื่อกำจัดองค์ประกอบอื่นที่ไม่ต้องการในวัตถุดิบ เช่น การระเบิดด้วยไอน้ำเพื่อกำจัดเอมิเซลลูโลส การใช้สารละลายเบสเพื่อกำจัดเอมิเซลลูโลสและลิกนิน เป็นต้น นอกจากนี้การปรับสภาพวัตถุดิบยังมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ลิกนินซึ่งมีสมบัติห่อหุ้มหรือเคลือบโครงสร้างของเซลลูโลสและเอมิเซลลูโลสแตกออกซึ่งเป็นการปรับสภาพวัตถุดิบให้ง่ายต่อการกำจัดสารประกอบประเภทลิกนินในขั้นตอนการฟอกขาวต่อไป

### 2.1 การปรับสภาพ (pretreatment)

วัสดุลิกโนเซลลูโลสนั้นประกอบด้วยส่วนหลักๆ คือ เซลลูโลส เอมิเซลลูโลส ลิกนิน ซึ่งเซลลูโลสและลิกนินจะอยู่ร่วมกันที่บริเวณผนังเซลล์ และเนื้อเยื่อชั้นในของเซลล์ โดยมีเอมิ-เซลลูโลสเป็นตัวเชื่อมประสานระหว่างเซลลูโลสและลิกนินเข้าไว้ด้วยกัน ทำให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรงสูง การปรับสภาพวัตถุดิบนั้นมีจุดประสงค์เพื่อให้โครงสร้างที่เป็นระเบียบหรือโครงสร้างที่เป็นผลึก (crystalline) ของเซลลูโลส และลิกนินที่ติดอยู่แตกออกจากกันดังภาพที่ 7 นอกจากนี้ยังกำจัดเอมิเซลลูโลส เพิ่มความเป็นรูพรุนของลิกโนเซลลูโลสและกำจัดลิกนิน (Sun and Cheng, 2002)



ภาพที่ 7 แบบจำลองลิกโนเซลลูโลสและการปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของลิกโนเซลลูโลส

ที่มา: Yousuf (2012)

โดยทั่วไปแล้ว กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถแบ่งออกเป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ การปรับสภาพทางเคมี (Chemical pretreatment) เช่น การปรับสภาพด้วยกรด การปรับสภาพด้วยด่าง การปรับ

สภาพด้วยโอโซน การปรับสภาพด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น การปรับสภาพทางกายภาพ (Physical pretreatment) เช่น การบด เป็นต้น การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี (Physicochemical pretreatment) เช่น การระเบิดด้วยไอน้ำ การระเบิดด้วยแอมโมเนีย เป็นต้น และการปรับสภาพทางชีวภาพ (Biological pretreatment) เช่น การปรับสภาพด้วยจุลินทรีย์ การปรับสภาพด้วยเอนไซม์ เป็นต้น ทั้งนี้ กระบวนการที่เหมาะสมในการปรับสภาพขึ้นอยู่กับชนิดและ ลักษณะสมบัติของวัตถุดิบที่นำมาใช้ ตารางที่ 2 แสดงกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีต่างๆพร้อมทั้งข้อดีและข้อจำกัดของแต่ละวิธี

ตารางที่ 2 ข้อดีและข้อจำกัดของการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีการต่างๆ

| วิธีการปรับสภาพ                                        | ข้อดี                                                                                                                                                                                                      | ข้อจำกัด                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1.ทางกายภาพ</b>                                     | เป็นการปรับสภาพเบื้องต้นโดยการลดขนาดวัตถุดิบ                                                                                                                                                               | ปริมาณพลังงานที่ใช้สูงและต้องใช้ร่วมกับกระบวนการปรับสภาพอื่นๆ                                                                                           |
| <b>2.ทางกายภาพร่วมกับเคมี</b>                          |                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| การระเบิดด้วยไอน้ำ                                     | ทำให้เกิดการย่อยสลายเฮมิ-เซลลูโลส และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนิน ใช้พลังงานต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ การบด ด้วยเครื่องจักรอย่างเดียว มีความคุ้มค่าเมื่อใช้ในการปรับสภาพไม้เนื้อแข็งและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร | มีประสิทธิผลน้อยเมื่อใช้กับไม้เนื้ออ่อน ทำลายสารประกอบเชิงซ้อนลิกนิน-คาร์โบไฮเดรตไม่สมบูรณ์ ก่อให้เกิดสารองค์ประกอบที่อาจไปขัดขวางการทำงานของจุลินทรีย์ |
| การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (Ammonia Fiber Explosion; AFEX) | สามารถกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส และเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ                                                                                                                                             | มีประสิทธิผลน้อยเมื่อใช้ในการปรับสภาพชีวมวลที่มีองค์ประกอบของลิกนินสูง                                                                                  |
| <b>3. ทางเคมี</b>                                      |                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |
| การปรับสภาพด้วยกรด                                     | ย่อยเฮมิเซลลูโลสจนกลายเป็นน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลชนิดอื่นๆ และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนิน                                                                                                                      | มีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าการปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี และจำเป็นต้องปรับ pH ให้เป็นกลางหลังจากปรับสภาพและกรดกัดกร่อนอุปกรณ์                              |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| วิธีการปรับสภาพ                                | ข้อดี                                                                                                                           | ข้อจำกัด                                                                                                              |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| การปรับสภาพด้วยต่าง                            | กำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเพิ่มพื้นที่ผิวของวัสดุดิบ เป็นกระบวนการที่ง่ายและไม่ต้องใช้พลังงานมากเมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยกรด | ต้องใช้เวลานานในการปรับสภาพ และเกิดเกลือเกาะกับวัสดุดิบ ซึ่งจำเป็นต้องทำการปรับ pH ให้เป็นกลางหลังจากทำการปรับสภาพ    |
| การปรับสภาพด้วยโอโซน                           | มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน                                                                                                   | ต้องใช้โอโซนปริมาณมากในกระบวนการปรับสภาพทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง                                                          |
| การปรับสภาพด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organosolv) | ย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส                                                                                                   | ต้องการการระเหย การควบแน่น และกระบวนการนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ และการกำจัดตัวทำละลายออกจากถัง                       |
| <b>4. ทางชีวภาพ</b>                            | ย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ใช้พลังงานน้อย ไม่ใช้สารเคมีในกระบวนการปรับสภาพ ทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม                       | อัตราการย่อยสลายที่เกิดขึ้นค่อนข้างต่ำ ทำให้ต้องใช้เวลานานในการย่อยสลาย และต้องการการควบคุมสภาวะการย่อยสลายที่เหมาะสม |

ที่มา: Kumar *et al.* (2009); Tomás-Pejó *et al.* (2011)

ในปัจจุบันกระบวนการและเทคโนโลยีที่ใส่ใจกับผลกระทบที่จะเกิดกับสิ่งแวดล้อมได้รับการสนใจเพิ่มขึ้น การปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสในปัจจุบันจึงนิยมวิธีการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ เนื่องจากไม่ต้องการสารเคมีและมีความคุ้มค่าเมื่อใช้ปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร นอกจากนี้การปรับสภาพทางชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์เป็นอีกวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากไม่ใช้สารเคมีในกระบวนการ ทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

### 2.1.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion)

การระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ในการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส โดยวัตถุดิบจะถูกเตรียมที่ความดันไอน้ำสูง และลดความดันลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งทำให้วัตถุดิบถูกระเบิดแล้วเกิดการสลายตัว การระเบิดด้วยไอน้ำใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 160–260 องศาเซลเซียส (ความดัน 0.69–4.8 MPa) วัฏระยะหนึ่ง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการย่อยสลายเอมิเซลลูโลส และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนิน เนื่องจากอุณหภูมิสูง ปัจจัยที่มีผลต่อการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ ได้แก่ ระยะเวลา, อุณหภูมิ ขนาด และปริมาณความชื้น (Sun and Cheng, 2002)

โดยในระหว่างการปรับสภาพ กรดอะซิติกที่เกิดจาก acetyl group ที่เกิดจากการถูกย่อยของเอมิเซลลูโลสและกรดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นเนื่องจากอุณหภูมิสูงในระหว่างการระเบิดด้วยไอน้ำ อาจมีผลให้เกิดการย่อยเอมิเซลลูโลสและลิกนินบางส่วนกลายเป็นน้ำตาลมอนอเมอร์ของกลูโคส และไซโลส (autohydrolysis) (Agbor *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังเกิดการทำลายพันธะไกลโคซิดิกในโครงสร้างของเอมิเซลลูโลสและพันธะอีเทอร์ ( $\beta$ -ether) ในโครงสร้างของลิกนิน ทำลายพันธะของสารประกอบเชิงซ้อนลิกนิน-คาร์โบไฮเดรต เปลี่ยนแปลงทางเคมีของโครงสร้างลิกนินและคาร์โบไฮเดรตในระหว่างการปรับสภาพวัตถุดิบ การระเบิดด้วยความดันไอน้ำสูง (Abdul Khalil *et al.*, 2012)

ข้อดีของการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ คือ ใช้พลังงานต่ำเมื่อเทียบกับการตัดและการบด โดยวิธีทางกายภาพใช้พลังงานมากกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำ 70 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ การระเบิดด้วยไอน้ำจะมีประสิทธิภาพสูงกับวัตถุดิบประเภทไม้เนื้อแข็งและของเหลือ ทางเกษตร แต่พบว่าประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อใช้วัตถุดิบประเภทไม้เนื้ออ่อน (Sun and Cheng, 2002)

Rocha *et al.* (2012) ศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและกำจัดลิกนินด้วยด่างสำหรับการสกัดเซลลูโลสเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล โดยวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของขานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำและองค์ประกอบทางเคมีของเอมิเซลลูโลสจากขานอ้อยหลังจากกำจัดลิกนินด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยผลการวิเคราะห์ของขานอ้อยทั้ง 20 ตัวอย่างที่แตกต่างกันทั้งด้านสายพันธุ์ ต้นกำเนิด ดินที่ปลูก ช่วงเวลาที่ปลูกและความแตกต่างทางสภาพอากาศ หลังจากปรับสภาพขานอ้อยด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าองค์ประกอบทางเคมีทั้งเซลลูโลส เอมิเซลลูโลส และลิกนินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้ง 20 ตัวอย่าง และหลังจากกำจัดลิกนินด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์องค์ประกอบทางเคมีก็ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ปริมาณเซลลูโลสเฉลี่ยของขานอ้อยดั้งเดิม หลังปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ และเอมิเซลลูโลสจากขานอ้อยหลังจากกำจัดลิกนินด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์มีค่าเท่ากับ 43.1% 57.5% และ 86.8% ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าการระเบิดด้วย

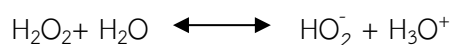
ไอน้ำไม่มีผลต่อปริมาณเซลลูโลสในองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพขนอ้อยเพื่อให้ได้เยื่อเซลลูโลสปริมาณสูง

## 2.2 การฟอกขาว (bleaching)

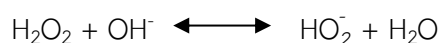
ในธรรมชาติเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจะเป็นสีขาว การที่เราเห็นเยื่อก่อนฟอกมีสีน้ำตาลเข้มมาจาก chromophoric group ที่มีอยู่ในลิกนิน กระบวนการฟอกขาวเป็นกระบวนการที่ทำให้ วัสดุลิกโนเซลลูโลส มีความขาวเพิ่มขึ้น และเป็นการกำจัดลิกนินออกไปด้วย โดยการใช้สารเคมีช่วย การฟอกขาวถือว่ามีความสำคัญต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการเตรียมเซลลูโลสบริสุทธิ์ โดยเฉพาะในวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่ไม่เป็นสีขาวและมีสีเข้ม สารฟอกขาวที่ใช้มีด้วยกันหลายประเภท สารฟอกขาวประเภทออกซิเดทิฟที่สำคัญได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (Sodium Hypochlorite) โซเดียมคลอไรต์ (Sodium Chlorite) ส่วนสารฟอกขาวประเภทรีดักทิฟที่สำคัญ ได้แก่ โซเดียมไฮโดรซัลไฟต์ (Sodium Hydrosulphite) และเปอร์ออกไซด์ สารฟอกขาวประเภทที่มีคลอรีนโดยเฉพาะ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ มักก่อให้เกิดสารประกอบ AOH (Absorbable Organic Halogens) ที่ปลดปล่อยออกมาในรูปแบบสารระเหิด ส่วนโซเดียมคลอไรต์แม้ว่าจะปลดปล่อยสาร AOH ปริมาณต่ำกว่าแต่ในการฟอกขาวเกิดสารคลอรีนไดออกไซด์ (Chlorine Dioxide) ที่เป็นพิษ ดังนั้นการฟอกขาวจึงนิยมใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งไม่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ ส่วนโซเดียมไฮโดรซัลไฟต์เป็นสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและเป็นพิษ (อภีรักษ์, 2554)

### 2.2.1 การฟอกขาวด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide)

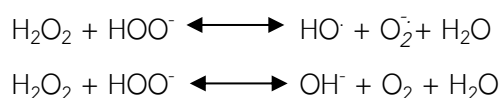
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นหนึ่งในสารเคมีที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเนื่องจากเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตามการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นิยมใช้กำจัดสารประกอบลิกนินภายใต้สภาวะเบส โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) แตกตัวในน้ำได้ hydronium ion ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) และ perhydroxyl ion ( $\text{HO}_2^-$ ) ดังสมการโดย perhydroxyl ion ทำหน้าที่เป็น nucleophilic bleaching agent ออกซิไดซ์กลุ่มคาร์บอนิลในโครงสร้างลิกนิน



และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการฟอกขาวโดยการเติมเบส ซึ่งเป็นการเร่งปฏิกิริยาดังสมการ



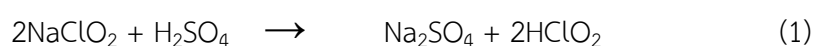
นอกจากเบสจะเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ยังสามารถสร้าง  $\text{HO}^\cdot$  และ  $\text{O}_2^\cdot$  ดังสมการ โดย  $\text{HO}^\cdot$  และ  $\text{O}_2^\cdot$  จะทำปฏิกิริยากับวงแหวนอะโรมาติกของลิกนินผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative decomposition) เป็นการเพิ่มโมเลกุลที่มีสมบัติละลายน้ำได้และเพิ่มการสลายตัวของลิกนิน



ดังนั้นการฟอกขาวโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายใต้สภาวะเบส จึงทำให้เยื่อมีความสว่างได้ แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเพียงการทำให้ลิกนินที่ก่อให้เกิดสีแตกตัวเท่านั้น ไม่ใช่เป็นการกำจัดลิกนินที่เหลืออยู่ในเยื่อ เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดการออกซิไดซ์กลุ่มคาร์บอนิลในคาร์โบไฮเดรตให้เปลี่ยนเป็นกลุ่มกรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งเป็นการทำให้สีของลิกนินที่เหลืออยู่ขาวขึ้น แต่จะกลับเป็นสีเหลืองได้ง่าย เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่สลายตัวง่าย แม้จะเก็บไว้โดยไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น จึงทำให้ลิกนินที่เหลืออยู่ในเยื่อรวมตัวกันได้อีกครั้ง ความขาวของกระดาษจึงลดลง (Bajpai, 2012b, 2012a)

## 2.2.2 การฟอกขาวด้วยโซเดียมคลอไรต์ (Sodium Chlorite bleaching)

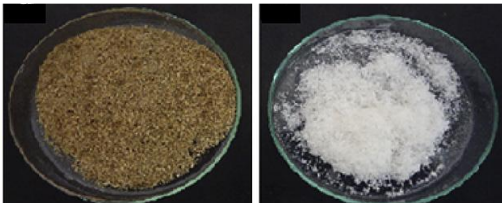
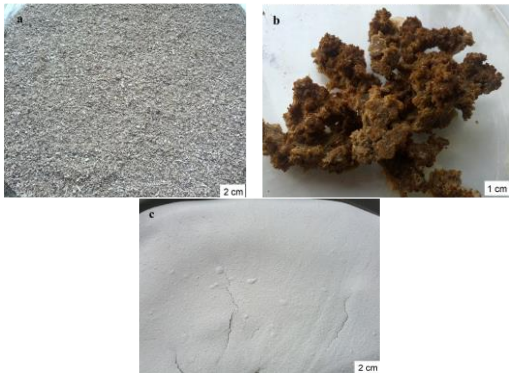
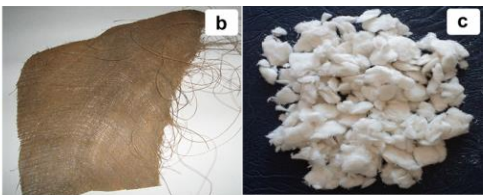
โซเดียมคลอไรต์เมื่อสลายตัวจะผลิตสารออกซิไดซ์อย่างแรง นั่นคือก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ อัตราการเกิดก๊าซคลอรีนเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรต์ในสารละลายการสลายตัวจะเกิดอย่างรวดเร็ว ที่ค่าพีเอชต่ำและอุณหภูมิสูง (สูงกว่า 70 องศาเซลเซียส) (Hubbell and Ragauskas, 2010) กรดคลอรัส ( $\text{HClO}_2$ ) ที่เกิดขึ้นจะไม่เสถียรและสลายเป็นคลอรีนไดออกไซด์ ( $\text{ClO}_2$ ) ซึ่งเป็นตัวที่ทำปฏิกิริยาในการฟอกขาวซึ่งแสดงดังสมการ (1) และ (2) ก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ จะเกิดขึ้นสูงสุดเมื่อพีเอชมีค่าระหว่างพีเอช 2.5 และ 3.0 ในสภาวะที่ไม่มีเยื่อและไอออนโลหะ เมื่ออัตราการก่อตัวของก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ประมาณสองเท่าจะทำให้พีเอชลดลงครึ่งละ 0.4 ซึ่งกระบวนการฟอกเยื่อต้องการพีเอชที่มีค่าระหว่าง 3.0 ถึง 5.0 อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ดังนั้นกระบวนการฟอกเยื่อโซเดียมคลอไรต์จึงแนะนำให้มีการเติมกรด อย่างเช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก หรือกรดฟอสฟอริก เพื่อปรับสภาพของระดับพีเอชให้อยู่ในช่วงระหว่าง 3.0 ถึง 5.5 เพราะถ้าระดับพีเอชลดลงต่ำกว่า 3.0 เส้นใยเซลลูโลสจะได้รับความเสียหายอย่างรุนแรง เพราะกรดคลอรัส ( $\text{HClO}_2$ ) และกรดไฮโดรคลอริก ( $\text{HCl}$ ) ที่เกิดขึ้นจะย่อยสลายเซลลูโลส (Abdel-Halim, 2012) แสดงดังสมการ (3)





ปัจจุบันโซเดียมคลอไรต์ได้รับความนิยมในการฟอกขาวมากขึ้น ตารางที่ 3 แสดงการใช้โซเดียมคลอไรต์ในการฟอกขาววัสดุเซลลูโลสชนิดต่างๆ ซึ่งทำให้เยื่อที่ผ่านการฟอกขาวมีสีที่ขาวมากขึ้นเนื่องจากลิกนินและเฮมิเซลลูโลสบางส่วนถูกกำจัด

ตารางที่ 3 การใช้โซเดียมคลอไรต์ในการฟอกขาววัสดุเซลลูโลสชนิดต่างๆ

| วัสดุเซลลูโลส                                   | ลักษณะเยื่อก่อนและหลังการฟอก                                                                                                           | แหล่งที่มา                         |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| เปลือกถั่ว<br>(soy hull)                        | soy hull      bleached soy hull<br>                  | Flauzino Neto <i>et al.</i> (2013) |
| เมล็ดมะม่วง<br>(mango seed)                     | mango seed      bleached mango seed<br>            | Henrique <i>et al.</i> (2013)      |
| หัวบีท<br>(de-pectinated sugar beet pulp: DSBP) | DSBP      alkali treated DSBP<br><br>Bleached DSBP | Li <i>et al.</i> (2014)            |
| ใยมะพร้าว (coconut palm leaf sheath)            | leaf sheath      bleached fiber<br>                | Uma Maheswari <i>et al.</i> (2012) |

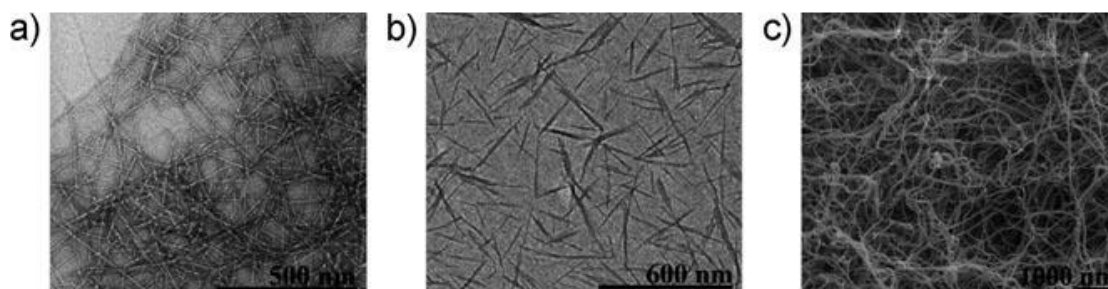
#### 4. นาโนเซลลูโลส (Nanocellulose)

นาโนเซลลูโลสหมายถึงเส้นใยเซลลูโลสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วงนาโนเมตร แต่อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลสขึ้นอยู่กับแหล่งของเซลลูโลสที่ใช้เตรียมและวิธีที่ใช้ในการคัดแยกนาโนเซลลูโลส นาโนเซลลูโลสจึงสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังตารางที่ 4 ได้แก่ (1) cellulose nanocrystals (CNC) (2) cellulose nanofibril (CNF) และ (3) bacterial cellulose (BC) (Klemm *et al.*, 2011) โดยภาพถ่ายของนาโนเซลลูโลสทั้งสามจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงดังภาพที่ 8

ตารางที่ 4 ประเภทของนาโนเซลลูโลส

| ประเภทของนาโนเซลลูโลส        | ชื่อเรียกอื่นๆ                                                                                     | ขนาด                                                                                                               |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cellulose nanocrystals (CNC) | nanocrystalline cellulose (NCC),<br>whiskers, rod like cellulose,<br>microcrystals                 | เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-70 นาโนเมตร<br>ความยาว 100-250 นาโนเมตร (พืช); 100 นาโนเมตรไปจนถึงไมโครเมตร (สาหร่ายแบคทีเรีย) |
| Cellulose nanofibrils (CNF)  | nanofibrils, microfibrils,<br>nanofibrillated cellulose (NFC),<br>microfibrillated cellulose (MFC) | เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-60 นาโนเมตร<br>ความยาวระดับไมโครเมตร                                                           |
| bacterial cellulose (BC)     | microbial cellulose,<br>bacterial nanocellulose (BNC)                                              | เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-70 นาโนเมตร                                                                                    |

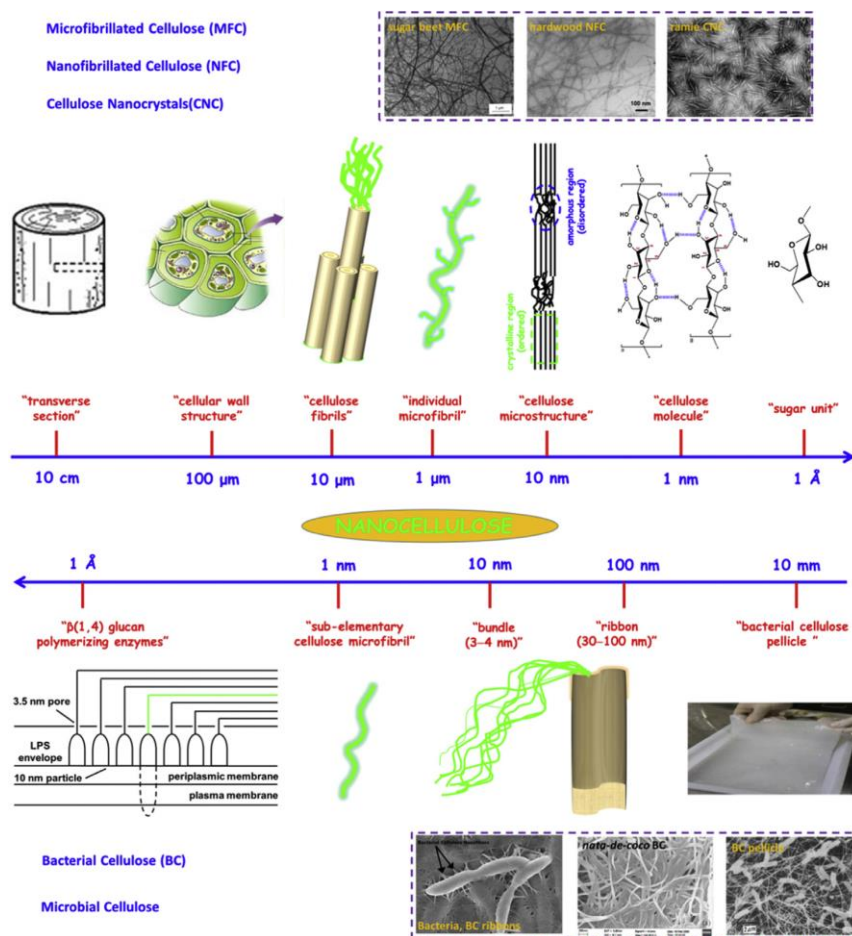
ที่มา: ดัดแปลงจาก Klemm *et al.* (2011)



ภาพที่ 8 ภาพถ่ายนาโนเซลลูโลสจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM); (a) microfibrillated cellulose (MFC), (b) nanocrystalline cellulose (NCC) และ (c) bacterial cellulose (BC)

ที่มา: Klemm *et al.* (2011)

นาโนเซลลูโลสสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์สายของกลูโคสภายในเซลล์ แล้วปล่อยออกทางรูของเยื่อหุ้มเซลล์ สายของกลูโคสประมาณ 36 เส้นจะรวมกันเป็นมัดของสายเซลลูโลส เรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibrils) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.5 นาโนเมตร และไมโครไฟบริลหลายๆมัดรวมกันกลายเป็นเส้นใยเซลลูโลสที่มีลักษณะแบบ ribbon ซึ่งมีความกว้างประมาณ 40-60 นาโนเมตร และรวมกันเป็นแผ่นเซลลูโลส (bacterial cellulose) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-100 นาโนเมตร (Lin and Dufresne, 2014; Pecoraro *et al.*, 2007) โดยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของโครงสร้าง ribbon และเส้นใยเซลลูโลสโดยการสังเคราะห์จากแบคทีเรียแสดงดังภาพที่ 12 (ด้านล่าง) ดังนั้นการสังเคราะห์เซลลูโลสของแบคทีเรียเป็นการสร้างจากโครงสร้างระดับโมเลกุลจากหน่วย Å ไปเป็นโครงสร้างขนาดเล็กระดับนาโนเมตร (nm) ซึ่งแบคทีเรียเซลลูโลสมีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีการเจือปนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเหมือนเซลลูโลสที่ได้จากพืช โดยเซลลูโลสในพืชจะพบโครงสร้างเซลลูโลสรวมตัวกันเป็นมัด เรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibrils) ซึ่งมีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร ดังนั้นการคัดแยกนาโนเซลลูโลสจากพืชจึงเป็นลดขนาดของเส้นใยเซลลูโลสจากไมโครไฟบริลเซลลูโลสหรือเส้นใยเซลลูโลสขนาดระดับไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ ) จนถึงขนาดเซนติเมตร (cm) กลายเป็นเส้นใยเซลลูโลสที่มีขนาดระดับนาโนเมตร (nm) (Lin and Dufresne, 2014) และจำเป็นต้องอาศัยวิธีการสกัดเซลลูโลสเพื่อให้ได้เซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์ก่อนการคัดแยกนาโนเซลลูโลสอีกด้วย ซึ่งแหล่งของนาโนเซลลูโลสจากพืชสามารถสกัดได้จากวัตถุดิบต่างๆ เช่น เนื้อไม้ ฝ้าย ชานอ้อย ชังข้าวโพด ฟางข้าว กากมันสำปะหลัง รวมไปถึงของเหลือทิ้งทางการเกษตรอื่นๆ โดยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ของ MFC คัดแยกจากต้นบีท (sugar beet) NFC คัดแยกจากไม้เนื้อแข็ง (hardwood) และ CNC คัดแยกจากป่านรามิ (ramie) แสดงดังภาพที่ 9 (ด้านบน)



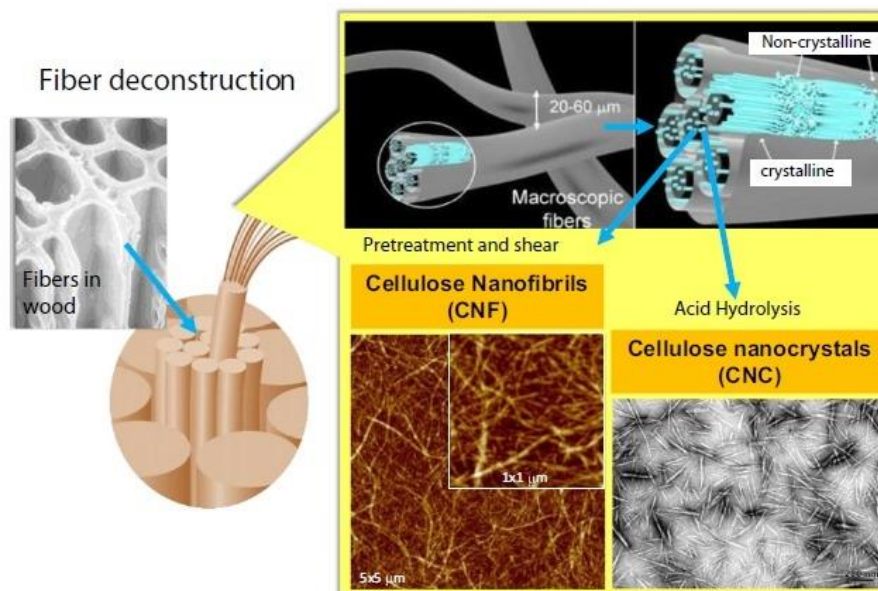
ภาพที่ 9 การสังเคราะห์เซลลูโลสโดยแบคทีเรียและโครงสร้างเซลลูโลสในพืช; (ด้านบน) ภาพ ถ่ายนาโนเซลลูโลสจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ของ cellulose nanocrystals (CNC), micro/nanofibrillated cellulose (MFC และ NFC); (ด้านล่าง) ภาพถ่ายนาโนเซลลูโลสจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของ bacterial cellulose (BC)

ที่มา: Lin and Dufresne (2014)

#### 4.1 การคัดแยกนาโนเซลลูโลส (Nanocellulose Isolation)

การคัดแยกนาโนเซลลูโลสสามารถคัดแยกได้หลายวิธี ปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้ในการคัดแยกนาโนเซลลูโลสจากวัตถุดิบเซลลูโลสได้แก่ วิธีทางเคมี และวิธีทางกล ภาพที่ 10 แสดงแผนผังการคัดแยกนาโนเซลลูโลสโดยวิธีทางเคมีและวิธีทางกล การคัดแยก cellulose nanocrystals (CNC) นิยมใช้สารเคมี โดยเฉพาะสารจำพวกกรด โดยกรดจะทำลายบริเวณอสัณฐานทำให้โครงสร้างของนาโนเซลลูโลสที่ได้เหลือ

เพียงผลึกของเซลลูโลส ขณะที่การใช้วิธีทางกล ทำให้ได้ cellulose nanofibrils (CNF) ซึ่งเส้นใยมีขนาดยาว ยึดหยุ่น ประกอบด้วยทั้งบริเวณอสัณฐานและบริเวณผลึก (Lin and Dufresne, 2014)



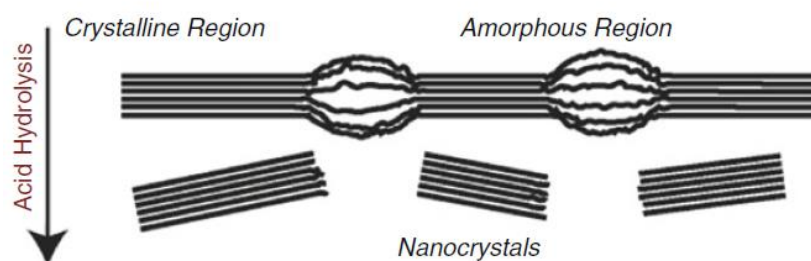
ภาพที่ 10 แผนผังการคัดแยก CNF และ CNC โดยวิธีทางกลและวิธีทางเคมีตามลำดับ

ที่มา: Salas *et al.* (2014)

#### 4.1.1 การคัดแยกนาโนเซลลูโลสโดยวิธีทางเคมี

การใช้สารเคมีโดยเฉพาะสารจำพวกกรดเป็นวิธีที่นิยมและใช้กันอย่างแพร่หลายในการคัดแยกนาโนเซลลูโลส (Peng *et al.*, 2011) โดยกรดที่นิยมใช้ได้แก่ กรดซัลฟิวริก ( $H_2SO_4$ ) และ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Habibi *et al.*, 2010) ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างของ CNC หลังจากการย่อยด้วยกรด โดยกรดจะทำลายพันธะของเซลลูโลสในส่วนอสัณฐาน (amorphous region) ทำให้เหลือเพียงส่วนบริเวณที่เป็นผลึกของเซลลูโลส (crystalline region) (Habibi *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2011) ดังนั้นลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของ CNC จึงมีลักษณะเหมือนเข็ม (needle-sonographic nanohydroxyapatite ed) มีขนาดเท่ากับหรือน้อยกว่า 100 นาโนเมตร และมีโครงสร้างผลึกสูง (Flauzino Neto *et al.*, 2013; Silvério *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลสที่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งของเซลลูโลสเริ่มต้นที่ใช้ในการคัดแยกนาโนเซลลูโลส ชนิดของกรด เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย ความเข้มข้นของกรดและอัตราส่วนระหว่างกรดต่อเซลลูโลส (Flauzino Neto *et al.*, 2013; Habibi *et al.*, 2010;

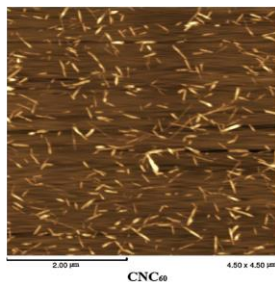
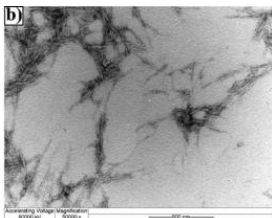
Peng *et al.*, 2011) ตารางที่ 5 แสดงการเตรียมนาโนเซลลูโลสจากแหล่งวัตถุดิบต่างๆ โดยการย่อยด้วยกรด พร้อมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนาโนเซลลูโลสที่คัดแยกได้



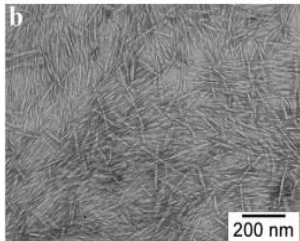
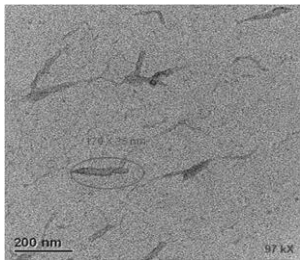
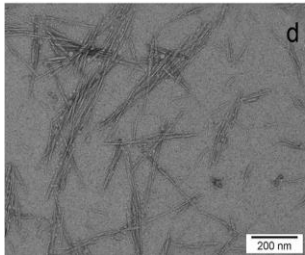
ภาพที่ 11 โครงสร้างของ CNC หลังจากการย่อยด้วยกรด

ที่มา: Thomas *et al.* (2011)

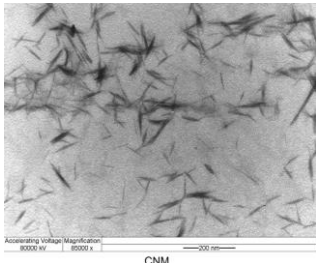
ตารางที่ 5 การเตรียมนาโนเซลลูโลสโดยการย่อยด้วยกรดจากแหล่งวัตถุดิบต่างๆ

| วัตถุดิบ                  | วิธีการคัดแยก                                                                                                                                                                                                                   | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา                                                                                                                                                                       | แหล่งที่มา                         |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| ซังข้าวโพด<br>(corn cob)  | <b>Purification</b><br>-2% (w/w) NaOH,<br>100 °C, 4 ชม<br>-1.7 wt % NaClO <sub>2</sub> /acetate<br>buffer, 80 °C, 6 ชม<br><b>Nanocellulose Isolation</b><br>-9.17 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,<br>45 °C , 30, 60, 90 นาที | <br>CNC <sub>60</sub><br>Length: 210.8±44.2 nm<br>Diameter: 4.15±1.08 nm<br>Aspect ratio: 53.4±15.8 nm | Silvério <i>et al.</i> (2013)      |
| เปลือกถั่ว<br>(soy hulls) | <b>Purification</b><br>-2% (w/w) NaOH,<br>100 °C, 4 ชม<br>-1.7 wt % NaClO <sub>2</sub> /acetate<br>buffer, 80 °C, 4 ชม<br><b>Nanocellulose Isolation</b><br>-64% (w/w) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 40 °C, 30, 40 นาที      | <br>CNC<br>Length: 122.7±39.40nm<br>Diameter: 4.43±1.20nm<br>Aspect ratio: 29.42±11.53nm               | Flauzino Neto <i>et al.</i> (2013) |

ตารางที่ 5 (ต่อ)

| วัตถุดิบ                       | วิธีการคัดแยก                                                                                                                                                                                                                                                        | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา                                                                                                                                                            | แหล่งที่มา                    |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| ฟางข้าว<br>(rice straw)        | <b>Purification</b><br>- 1.4% NaClO <sub>2</sub> , 70 °C, 5 ชม<br>- 5% KOH, 90 °C, 2 ชม<br><b>Nanocellulose isolation</b><br>-64-65% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 45 °C<br>30, 45 นาที                                                                           |  <p>CNC</p> <p>Length: 117±39nm</p> <p>Diameter: 11.2±3.6 nm</p> <p>Aspect ratio: 10.5 nm</p> | Lu and Hsieh (2012)           |
| ชานอ้อย<br>(Sugarcane bagasse) | <b>Purification</b><br>-0.7% (w/v) NaClO <sub>2</sub> , 5 ชม<br>-5% Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 5 ชม<br>-17.5% (w/v) NaOH, 5 ชม<br>-dimethyl sulfoxide, 80 °C, 5 ชม<br><b>Nanocellulose Isolation</b><br>-60% (w/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50 °C, 5 ชม |  <p>Nanocellulose</p> <p>Length: 170 nm</p> <p>Diameter: 35 nm</p>                           | Mandal and Chakrabarty (2011) |
| เปลือกมะเขือเทศ (tomato peels) | <b>Purification</b><br>-toluene/ethanol (2:1, v/v), 20 ชม<br>-1.4% NaClO <sub>2</sub> , 70 °C, 5 ชม<br>-5% KOH, 24 ชม<br><b>Nanocellulose Isolation</b><br>-64 wt% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 45 °C, 30 นาที                                                   |  <p>CNC</p> <p>Length: 135±50 nm</p> <p>Diameter: 7.2±1.8 nm</p>                            | Jiang and Hsieh (2015)        |

ตารางที่ 5 (ต่อ)

| วัตถุดิบ                    | วิธีการคัดแยก                                                                                                                                                                                                                | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา                                                                                                                                                      | แหล่งที่มา                       |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| เมล็ดมะม่วง<br>(mango seed) | <b>Purification</b><br>-2%(w/w) NaOH, 100°C,<br>4 ชม (4 ครั้ง)<br>-1.7% NaClO <sub>2</sub> /acetate buffer<br>80°C, 6 ชม<br><br><b>Nanocellulose Isolation</b><br>-11.21M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 40 °C,<br>10 นาที | <br>CNC<br>Length: 123.4±22.1nm<br>Diameter: 4.59±2.22 nm<br>Aspect ratio: 34.1±18.6 nm | Henrique <i>et al.</i><br>(2013) |

#### 4.1.2 การคัดแยกนาโนเซลลูโลสโดยวิธีทางกล

ปัจจุบันมีการศึกษา พัฒนาและปรับปรุงกระบวนการสกัดนาโนเซลลูโลสให้มีประสิทธิภาพ การคัดแยกนาโนเซลลูโลสโดยวิธีทางกลจึงได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ต้องการสารเคมีในกระบวนการคัดแยก แต่อย่างไรก็ตามก่อนการคัดแยกนาโนเซลลูโลสโดยวิธีทางกล แหล่งวัตถุดิบเซลลูโลสที่ใช้ในการคัดแยก ต้องผ่านการปรับสภาพทางเคมี เพื่อกำจัดองค์ประกอบอื่นๆ ให้ได้เซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์ การคัดแยกนาโนเซลลูโลสโดยวิธีทางกล ได้แก่ กระบวนการโฮโมจีไนเซชันแรงดันสูง (high pressure homogenization) ไมโครฟลูอิดิเซชัน (microfluidization) การบดละเอียด (grinding) และกระบวนการอัลตราโซนิก ความเข้มสูง (high intensity ultrasonication) เป็นต้น

##### 4.1.2.1 กระบวนการโฮโมจีไนเซชันแรงดันสูง (High pressure homogenization)

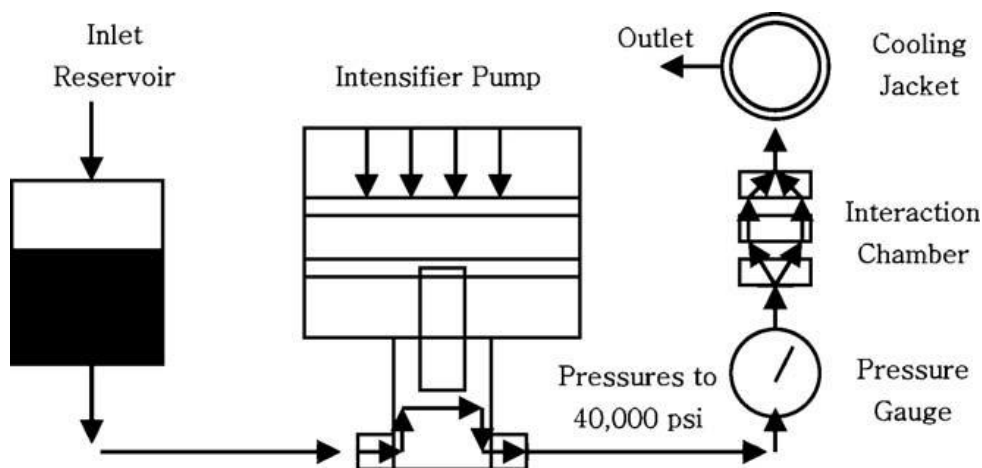
กระบวนการโฮโมจีไนเซชันแรงดันสูง (High pressure homogenization: HPH) เป็นการลดขนาดของเหลวเพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ไมโครฟลูอิดิเซอร์ (microfluidizer) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีกลไกเหมือนกับโฮโมจีไนเซชันแรงดันสูง โดยเยื่อจะผ่านท่อเกิดปฏิกิริยา (Interaction chamber) ที่มีลักษณะ Z sonu ภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต e (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 200-400  $\mu\text{m}$ ) (ภาพที่ 12) ภายใต้สภาวะแรงดันสูง ดังนั้นเส้นใยเซลลูโลสจะถูกแรงดันสูงดันผ่าน Z chamber เกิดอัตราแรงเฉือนสูง (high shear rate) ทำให้ขนาดของเส้นใยเซลลูโลสลดลงและปลดปล่อยเส้นใยเซลลูโลสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วงนาโนเมตร ภาพที่ 13 แสดงส่วนประกอบเครื่องไมโครฟลูอิดิเซอร์ (microfluidizer) ใน

กระบวนการโฮโมจีไนเซชันแรงดันสูง ซึ่งประกอบด้วย ถังเก็บตัวอย่าง (Reservoir) ไว้สำหรับใส่ตัวอย่าง ปัมแรงดันสูง (Intensifier pump) ทำหน้าที่ให้แรงดัน เครื่องวัดแรงดัน (Pressure gauge) ท่อเกิดปฏิกิริยา (Interaction chamber) และเครื่องหล่อเย็น (Cooling jacket) ทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ โดยกลไกของกระบวนการโฮโมจีไนเซชันแรงดันสูง คือ บังคับให้ของเหลวผ่านช่องแคบโดยใช้ปั๊มความดันสูง เกิดแรงกระทำต่างๆต่อตัวอย่างอย่างรุนแรงภายในท่อเกิดปฏิกิริยา แรงดันสูง (high pressure) แรงเฉือนสูง (high shear) อัตราความเร็วสูง (high velocity) การเคลื่อนไหวของของเหลวอย่างไม่เป็นระเบียบ (turbulence) ซึ่งแรงดังกล่าวทำให้เกิดการทำลายบริเวณอสัณฐาน ลดขนาดของเส้นใยเซลลูโลสและท้ายที่สุดปลดปล่อยเซลลูโลสไมโครไฟบริลหรือเส้นเซลลูโลสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วงนาโนเมตร (Lee *et al.*, 2009)



ภาพที่ 12 เครื่องไมโครฟลูอิดเซอร์ microfluidizer (M-110EH 30) และ Z-chamber

ที่มา: Lavoine *et al.* (2012)

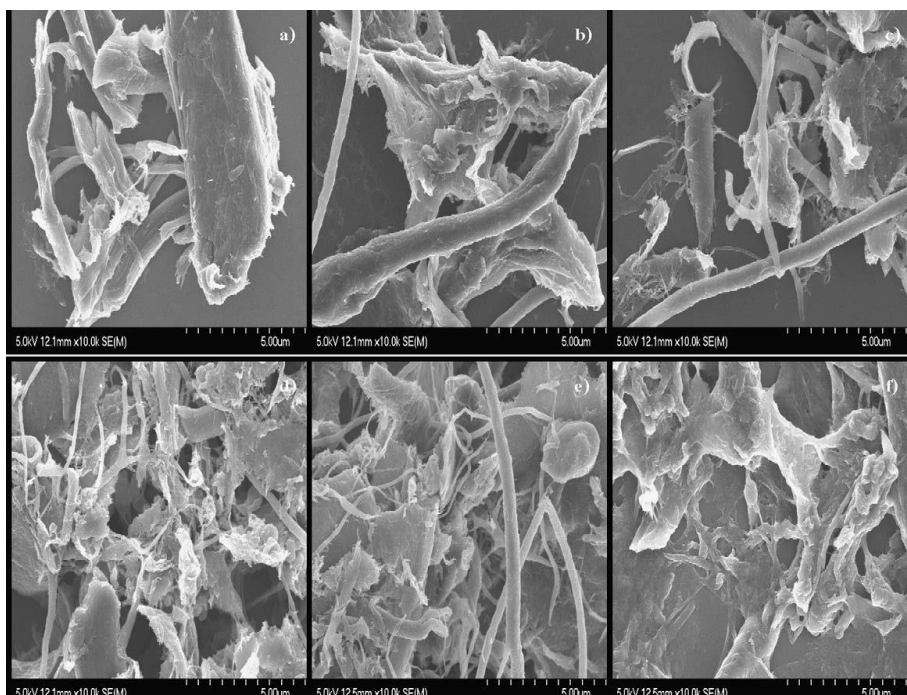


ภาพที่ 13 ส่วนประกอบของเครื่องไมโครฟลูอิดเซอร์ (microfluidizer) ในกระบวนการโฮโมจิไนเซชันแรงดันสูง (microfluidics, U.S.A.)

ที่มา: Lee *et al.* (2009)

อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้ไมโครฟลูอิดเซอร์ (microfluidizer) ในการผลิตเซลลูโลสนาโนไฟบริลขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น แรงดันและจำนวนรอบ เป็นต้น (Abdul Khalil *et al.*, 2014; Lavoine *et al.*, 2012)

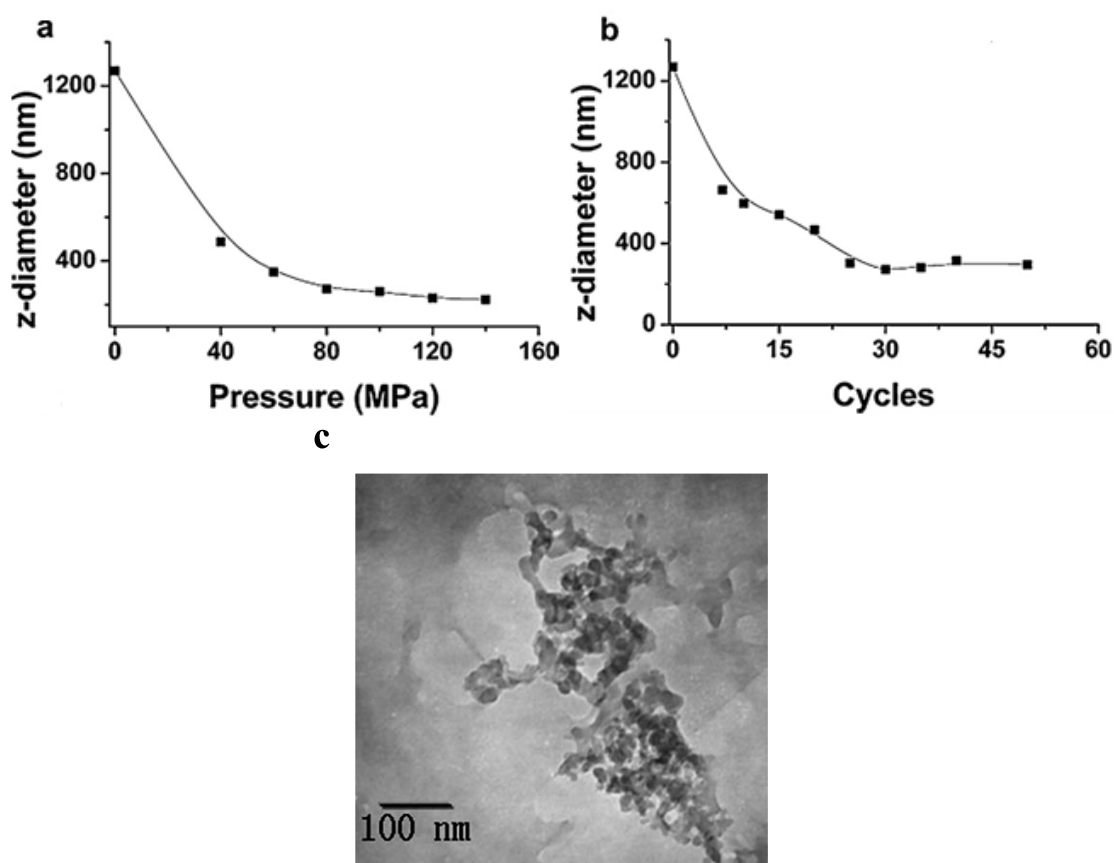
Lee *et al.* (2009) เตรียมเซลลูโลสนาโนไฟบริลจากไมโครคริสตัลไลน์เซลลูโลส (microcrystalline cellulose; MCC) โดยใช้ไมโครฟลูอิดเซอร์ (microfluidizer) โดยศึกษาจำนวนรอบที่ 0, 1, 5, 10, 15 และ 20 รอบ ที่ความดัน 20,000 psi พบว่า ที่จำนวนรอบ 10-15 รอบ ขนาดของเส้นใยเซลลูโลสมีขนาดลดลงตามจำนวนรอบ ยิ่งจำนวนรอบเพิ่มขึ้นเส้นใยเซลลูโลสนาโนไฟบรียิ่งมีขนาดเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยเริ่มต้น และเมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้นถึง 20 รอบ พบว่า เส้นใยเซลลูโลสนาโนไฟบริลที่ได้เกิดการรวมกลุ่มเล็กน้อย ดังภาพที่ 14



**ภาพที่ 14** ภาพถ่ายเส้นใยเซลลูโลสจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM); (a) เส้นใยที่ผ่านไฮโมจีไนเซอร์ 1 รอบ (b) เส้นใยที่ผ่านไฮโมจีไนเซอร์ 2 รอบ (c) เส้นใยที่ผ่านไฮโมจีไนเซอร์ 5 รอบ (d) เส้นใยที่ผ่านไฮโมจีไนเซอร์ 10 รอบ (e) เส้นใยที่ผ่านไฮโมจีไนเซอร์ 15 รอบและ (f) เส้นใยที่ผ่านไฮโมจีไนเซอร์ 20 รอบ

ที่มา: Lee *et al.* (2009)

Li *et al.* (2012) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้กระบวนการไฮโมจีไนเซชันแรงดันสูงสำหรับเตรียมนาโนเซลลูโลสจากขานอ้อย โดยความดันที่ใช้ในการศึกษาตั้งแต่ 40 ถึง 140 MPa และศึกษาจำนวนรอบถึง 50 รอบ พบว่า ขนาดของเส้นใยลดลงตามจำนวนความดันที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อความดันที่ใช้มากกว่า 80 MPa ขนาดของเส้นใยคงที่ ดังภาพที่ 15(a) และเมื่อกำหนดความดันที่ 80 MPa พบว่าขนาดของเส้นใยลดลงเมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้นแต่ที่จำนวนรอบ 40 และ 50 รอบเส้นใยมีขนาดคงที่ (ภาพที่ 18(b)) ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมนาโนเซลลูโลส คือ ความดัน 80 MPa จำนวน 30 รอบ นาโนเซลลูโลสที่เตรียมได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-20 นาโนเมตร ดังภาพที่ 18 (c)



ภาพที่ 15 ขนาดของนาโนเซลลูโลสที่ (a) ความดันและ(b) จำนวนรอบ ที่แตกต่างกันและ (c) นาโนเซลลูโลสที่เตรียมได้ที่ 80 MPa จำนวน 30 รอบ

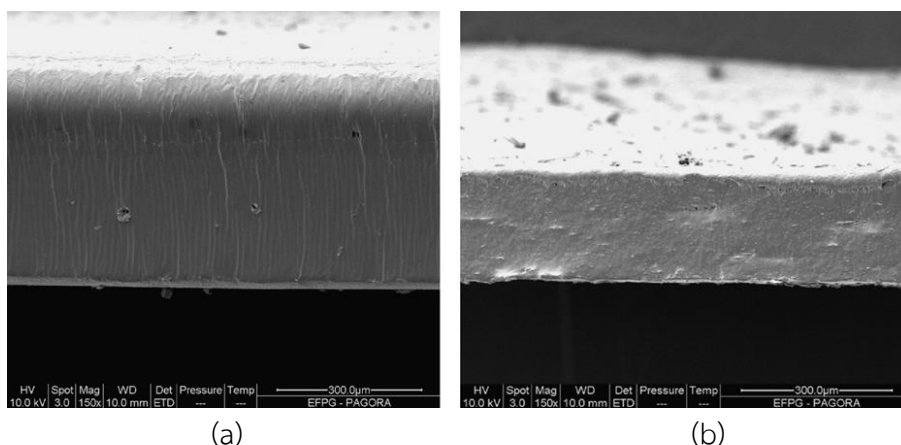
ที่มา: Li *et al.* (2012)

## 5. การประยุกต์ใช้นาโนเซลลูโลส (Applications of Nanocellulose)

ในปัจจุบันมีความพยายามในการปรับปรุงสมบัติของพอลิเมอร์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะวัสดุนาโนคอมโพสิต (Nanocomposites) ซึ่งเป็นการเติมอนุภาคขนาดเล็กในระดับนาโนลงไปกระจายในเนื้อสารที่ต้องการ เซลลูโลสเป็นหนึ่งในที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมแรง (reinforcements) ผสมในพอลิเมอร์ต่างๆ ช่วยทำให้วัสดุที่ได้มีความแข็งแรงมากขึ้น เช่น การผลิตกระดาษให้แข็งแรงมากยิ่งขึ้น รวมถึงช่วยในด้านการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิเมอร์ได้อีกด้วย (Biodegradation)

Bras *et al.* (2010) สกัดเซลลูโลสวิสเกอร์ (Cellulose whiskers) จากชานอ้อย ซึ่งเซลลูโลสวิสเกอร์ที่สกัดได้มีขนาด ยาว 84-102 นาโนเมตร กว้าง 4-12 นาโนเมตร เพื่อใช้เป็นสารเสริมแรงในยางธรรมชาติ (ภาพที่ 16) โดยศึกษาอิทธิพลของปริมาณเซลลูโลสวิสเกอร์ (0-12 wt%) ที่มีผลต่อความต้านทานแรงดึง

(tensile strength) คุณสมบัติด้านความร้อน (thermal properties) การดูดซับความชื้น (moisture sorption) การซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor permeation) และการย่อยสลายทางชีวภาพของวัสดุนาโนคอมโพสิตในดิน (soil biodegradation) พบว่าเมื่อใช้เซลลูโลสวิสเกอร์เป็นสารเสริมแรงในยางสามารถพัฒนา ค่ายังค้มอดุลัส (Young's modulus) และความสามารถในการดึงยึดของวัสดุ (Tensile strength) ผลจาก Dynamic mechanical thermal analysis (DMA) และ differential scanning calorimetry (DSC) พบว่า ไม่เปลี่ยนแปลงค่า glass transition temperature ( $T_g$ ) ของเมทริกซ์ยางตามการเพิ่มขึ้นของเซลลูโลส วิสเกอร์ วัสดุนาโนคอมโพสิตสามารถเพิ่มการดูดซับน้ำได้เมื่อใช้ปริมาณเซลลูโลสวิสเกอร์ร้อยละ 5 และมี แนวโน้มลดลงเมื่อปริมาณของเซลลูโลสวิสเกอร์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่าการมีเซลลูโลสวิสเกอร์ช่วยเพิ่มอัตรา การย่อยสลายทางชีวภาพได้ซึ่งพบอัตราการย่อยสลายสูงสุดถึงร้อยละ 71 ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อนา โนคอมโพสิตยางมีเซลลูโลสวิสเกอร์ในองค์ประกอบสูงสุดร้อยละ 12.5

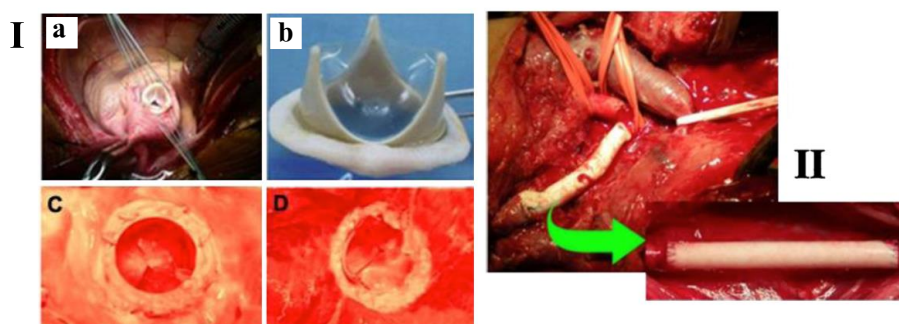


**ภาพที่ 16** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดยางธรรมชาติ (natural rubber) (a) ยาง ธรรมชาติ/เซลลูโลสวิสเกอร์นาโนคอมโพสิตที่ประกอบด้วยเซลลูโลสวิสเกอร์จากขานอ้อยร้อยละ 10 (b)

ที่มา: Bras *et al.* (2010)

คุณสมบัติที่สำคัญของเซลลูโลสก็คือ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) สามารถเข้า กันได้กับเนื้อเยื่อของมนุษย์ จึงมีการประยุกต์ใช้ในการแพทย์ Cherian *et al.* (2011) ศึกษาการนำเส้นใย นาโนเซลลูโลสที่สกัดจากเส้นใยใบสับปะรด ผสมกับพอลิยูรีเทน ใช้ในการแพทย์เพื่อผลิตลีนหัวใจเทียม ดังภาพที่ 17 ซึ่งพบว่าลีนหัวใจที่พัฒนาจากวัสดุคอมโพสิตเส้นใยนาโนเซลลูโลส-พอลิยูรีเทน ที่ทดลองใน โมเดลหนู มีความยั่งยืนทางชีวภาพที่ดี มีความต้านทานต่อความล้าที่ดี (Fatigue resistance) ซึ่งคือวัสดุ สามารถทนทานต่อแรงที่กระทำซ้ำๆ ตลอดเวลาจนกระทั่งวัสดุเกิดความล้าได้ดี ประสิทธิภาพการทำงานด้าน

พลังไหลเวียนเลือดที่ผิดปกติ (Haemodynamic) นอกจากนี้โรคหลอดเลือดหัวใจ (Atherosclerotic cardiovascular disease) เป็นหนึ่งในสาเหตุของการเจ็บป่วยและการตายในโรคหัวใจ ซึ่งเป็นโรคหัวใจที่เกิดจากการตีบและแข็งตัวของหลอดเลือดแดง ทำให้เลือดไปเลี้ยงที่กล้ามเนื้อหัวใจลดลงหรือชะงักไป ส่งผลให้มีเลือดไปเลี้ยงอวัยวะส่วนปลายน้อยลงและในที่สุดอาจจะเกิดการตายของเนื้อเยื่อส่วนปลาย เส้นใยนาโนเซลลูโลส-พอลิยูรีเทน เป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติยืดหยุ่น พร้อมทั้งทำให้การแข็งตัวของเลือดต่ำและคุณสมบัติทางกายภาพและเชิงกลที่ผิดปกติจึงนำไปสู่การพัฒนาของนาโนเซลลูโลส-พอลิยูรีเทน เพื่อเป็นหลอดเลือดเทียม (รูปที่ 20 (II)) ซึ่งหลอดเลือดเทียมนาโนเซลลูโลส-พอลิยูรีเทน มีความหนาของผนังเพียง 0.7-1.0 มิลลิเมตร แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวก่อนขาด (elongation at break) ร้อยละ 800-1200 และทนแรงดันได้ถึง 300 กิโลปาสคาล



ภาพที่ 17 (I) ลิ้นหัวใจเทียม นาโนเซลลูโลส-พอลิยูรีเทน (a) ลิ้นหัวใจเทียมที่ฝังอยู่กับเนื้อเยื่อ (b) ลิ้นหัวใจ (c) แสดงผิวหน้าไหลเข้า (d) แสดงผิวหน้าไหลออก (II) หลอดเลือดเทียมที่ทำจากนาโนเซลลูโลส-พอลิยูรีเทนที่วางอยู่ระหว่างแขนงบราคิโอเซฟาสิก ทังก์ (brachiocephalic trunk) และหลอดเลือดแดงคอโรติด (carotid artery) ในผู้ป่วยเพศชายอายุ 26 ปีที่เป็นโรค multiple endocrine neoplasia (MEN 2B)

ที่มา: Cherian *et al.* (2011)

## 6. โครงร่างเลี้ยงเซลล์

โครงร่างเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) เป็นวัสดุทางการแพทย์ที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอวัยวะในร่างกายมนุษย์ มีลักษณะเป็นรูพรุนเป็นช่องว่างเพื่อให้เซลล์ตั้งต้นสามารถเจริญเติบโตเข้าไปภายใน (ingrowths) ได้ โดยรูพรุนดังกล่าวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในระดับไมโครเมตรและมีขนาดที่จำเพาะกับชนิดของเซลล์ที่นำมาปลูก นอกจากนี้ วัสดุโครงร่างเลี้ยงเซลล์ต้องมีสมบัติทางชีวภาพที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตและสถานะภายในร่างกายสิ่งมีชีวิต กล่าวคือ ต้องมีความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatible) ไม่เป็นพิษต่อ

เซลล์ (non-cytotoxic) มีความสามารถในการกระตุ้นทางชีวภาพ (bioactive) และอาจสามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ (Biodegradable) ในกรณีที่ไม่ต้องการให้วัสดุเหลืออยู่ในร่างกายมนุษย์เมื่อกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ใหม่ได้เสร็จสิ้นแล้ว

ก่อนปี พ.ศ. 2543 วัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถผลิตอุปกรณ์ที่เข้ากันได้กับกระแสเลือด มีเนื้อเยื่อเทียมสำหรับรักษาซ่อมแซมเนื้อเยื่อในร่างกาย วัสดุอุดฟันและทางทันตกรรม อุปกรณ์และวัสดุที่ช่วยในการรักษากระดูกและทดแทนข้อต่อหรือกระดูกที่เสียหาย วัสดุปิดแผลเพื่อรักษาผู้ป่วยจากไฟไหม้และน้ำร้อนลวก หรือเป็นโรคผิวหนัง และโดยเฉพาะมีการสร้างโครงร่างเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีการศึกษาอยู่ 2 ลักษณะ คือ โครงร่างที่สังเคราะห์ขึ้นใช้ฝังในร่างกายเพื่อแทนที่อวัยวะเดิมที่เสื่อม และโครงร่างที่ใช้ฝังเพื่อกระตุ้นในร่างกายเสริมสร้างเซลล์ขึ้นเพื่อซ่อมแซมตัวเอง (เรืองรอง พิมพ์พร และวีรศักดิ์, 2551)

การออกแบบโครงร่างเลี้ยงเซลล์ควรต้องคำนึงถึง (1) ผิวหน้าของโครงร่างต้องเหมาะกับการเกาะติดของเซลล์ และส่งเสริมให้เซลล์ซ่อมแซมตัวเองเป็นผลต่อการสร้างเนื้อเยื่อที่ต้องการ (2) ควรจะเข้ากับเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ โดยที่พอลิเมอร์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของพอลิเมอร์ที่ใช้ต้องไม่เป็นพิษกับสิ่งมีชีวิต (3) โครงร่างควรจะย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (4) ควรมีรูพรุนเพียงพอและขนาดเหมาะสมที่จะทำให้เซลล์ยึดเกาะได้ และ (5) วัสดุที่ใช้สามารถผลิตได้ง่ายต่อการขึ้นรูปโครงสร้างสามมิติและความแข็งแรงเพียงพอสำหรับสารพอลิเมอร์ที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงร่างเลี้ยงเซลล์ จะมีได้ทั้งสองแบบ คือ พอลิเมอร์สังเคราะห์ขึ้นที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เช่น polyglycolide, PCL, polycarbonate, PGA, PLA และพอลิเมอร์ชีวภาพ เช่น คอลลาเจน ไคโตซาน เซรีซิน ไฟโบรอิน โกลโคสไมโนไกลเคน อัลจิเนต อัลบูมิน ไฮดรอกซีแอพาไทต์ (Chen *et al.*, 2002)

## 6.1 งานวิจัยเกี่ยวกับโครงร่างเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) ของเซลล์โลส

การวิจัยและพัฒนาทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อที่จะพัฒนาวัสดุทดแทนทางชีวภาพ โดยอาศัยการเกิดขึ้นใหม่ของเซลล์เข้าไปในแม่แบบที่เรียกว่าโครงร่างเลี้ยงเซลล์ (scaffold) โดยใช้เซลล์โลสได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากความต้องการด้านการใช้งานโครงร่างเลี้ยงเซลล์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น ต้องการให้โครงร่างเลี้ยงเซลล์มีสมบัติเชิงกลที่เหมาะสม เพื่อที่โครงร่างเลี้ยงเซลล์จะยังคงรูปและความแข็งแรงอยู่ได้ในระหว่างที่เซลล์เกิดกิจกรรมและพัฒนาการอยู่ในโครงร่างเลี้ยงเซลล์นั้น ทั้งนี้รวมถึงช่วงเวลาโครงร่างเลี้ยงเซลล์กำลังเกิดการสลายตัวทางชีวภาพด้วย โดย Mathew และคณะ ในปี 2012 ศึกษาโครงร่างเลี้ยงเซลล์เส้นใยนาโนเซลล์โลสเพื่อพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพเพื่อใช้แทนเอ็นหรือเส้นเอ็น ซึ่งนาโนคอมโพสิตเตรียมโดยการละลายเส้นใยนาโนเซลล์โลสบางส่วนโดยใช้ ionic liquid ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลาที่แตกต่างกัน (90 และ 120 นาที) ผลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงให้เห็นว่าเส้นใยของนาโนเซลล์โลสคอมโพ

ลิตประกอบด้วยส่วนที่ละลายทำหน้าที่เป็นเมทริกซ์ ส่วนเส้นใยที่ไม่ละลายทำหน้าที่เป็นเฟสเสริมแรง คุณสมบัติเชิงกลของวัสดุคอมโพสิตหลังจากฆ่าเชื้อโดยใช้รังสีแกมมาจำลองที่อุณหภูมิร่างกาย (37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ (RH) เท่ากับ 95) ซึ่งเทียบได้กับธรรมชาติของเอ็นและเส้นเอ็นพบว่าที่อุณหภูมิร่างกายและสภาพเปียกชื้น ค่าความแข็งแรง (tensile strength) และ โมดูลัสความยืดหยุ่น (modulus of elasticity) จะมีค่าน้อยกว่าที่อุณหภูมิแห้งทั้งที่มีการฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อ ซึ่งค่าความแข็งแรงอยู่ในช่วง 28- 38 MPa แสดงผลที่มีเสถียรภาพสามารถยืนยันความเป็นไปได้สำหรับการใช้วัสดุคอมโพสิตนี้แทนเอ็นหรือเส้นเอ็น นอกจากนี้ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) พบว่านาโนคอมโพสิตที่ละลายด้วย ionic liquid เป็นเวลา 90 นาทีไม่แสดงความเป็นพิษ และความเข้ากันได้ทางชีวภาพตอบสนองเชิงบวกทั้งการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (proliferation) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการละลายบางส่วนของเส้นใยนาโนมีศักยภาพในการพัฒนาวัสดุที่มีคุณสมบัติเชิงกลและ cytocompatibility ที่ดี ซึ่งต้องการสำหรับประยุกต์ใช้ในงานทางการแพทย์ได้

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาโครงร่างเลี้ยงเซลล์ โดยการใช้โครงร่างเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ที่ประกอบไปด้วยวัสดุหลายชนิดเพื่อเป็นการเสริมข้อดีของวัสดุแต่ละชนิดเข้าด้วยกันในการที่จะผลิตโครงร่างเลี้ยงเซลล์ให้มีสมบัติตามที่ต้องการทั้งในแง่ของความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ความสามารถในการสลายตัวทางชีวภาพ ความสามารถในการผลิตขึ้นรูป และสมบัติเชิงกลที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น Pooyan และคณะ ในปี 2013 ได้ออกแบบเซลล์ูโลสนาโนคอมโพสิตเพื่อประยุกต์ใช้เป็นโครงร่างเลี้ยงเซลล์สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยนาโนคอมโพสิตประกอบด้วย เซลล์ูโลสนาโนวิสเกอร์ (cellulose nanowhiskers; CNWs) คอมโพสิตในเซลล์ูโลส อะซิเตท โพรพิโอเนต (cellulose acetate propionate, CAP) โดยพบว่าเซลล์ูโลสนาโนวิสเกอร์สามารถเพิ่มความแข็งแรงในวัสดุคอมโพสิต CNW-CAP ได้แม้จะมีเซลล์ูโลสนาโนวิสเกอร์อยู่เพียง 0.2 wt%

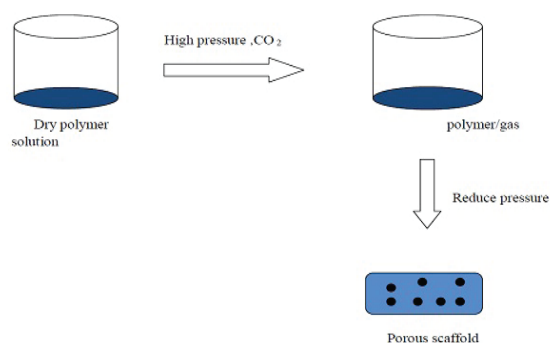
คุณลักษณะของโครงร่างเลี้ยงเซลล์ที่ดี ที่ต้องการอีกประการหนึ่งคือ มีการเชื่อมต่อของรูพรุนภายในโครงร่างเลี้ยงเซลล์อย่างทั่วถึง รูพรุนที่เกิดขึ้นจะต้องมีขนาดที่เหมาะสมในการที่เซลล์และสารองค์ประกอบนอกเซลล์จะเกิดการเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกได้โดยง่าย เพื่อที่จะนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อสำหรับเนื้อเยื่อแต่ละประเภทได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย Xing และคณะ ในปี 2010 ศึกษาโครงร่างเลี้ยงเซลล์รูพรุนสามมิติที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ูโลสไมโครไฟเบอร์ / เจลาตินคอมโพสิตสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์สมองและ human mesenchymal stem cells (hMSCs) ภาพถ่ายจาก Scanning electron microscopy (SEM) แสดงให้เห็นว่าโครงร่างเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเส้นใยเซลล์ูโลส/เจลาติน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูเฉลี่ยประมาณ  $69 \pm 4$  ไมโครเมตร ซึ่งมีความเป็นรูพรุนสูง (high porosity) มากถึง 70% ซึ่งจากภาพโครงร่างเลี้ยงเซลล์สามมิติ สนับสนุนการยึดติดของเซลล์และการเจริญของเซลล์สมองหลังจากการเจริญเป็นเวลา 16 วัน พบว่าการเจริญของเซลล์ในโครงร่างเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเส้นใยเซลล์ูโลส/เจลาตินช่วยให้การเจริญของเซลล์สมองมีการกระจายตัวที่ดีกว่า การเจริญของเซลล์สมองในโครงร่างเลี้ยงเซลล์ที่

ประกอบด้วยเจลาตินเพียงอย่างเดียว ซึ่งการเจริญของเซลล์สมองเป็นกลุ่มก้อนมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่า โครงร่างเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยเส้นใยเซลลูโลส/เจลาติน ยังช่วยสนับสนุนการเจริญของเซลล์ hMSCs ได้อีกด้วย ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าการมีเส้นใยเซลลูโลสช่วยให้รูพรุนมีขนาดที่เหมาะสม ทำให้เกิดมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ที่เกิดขึ้นภายในโครงเลี้ยงเซลล์

## 6.2 การเตรียมโครงร่างเลี้ยงเซลล์

การเตรียมโครงร่างเลี้ยงเซลล์สามารถขึ้นรูปได้หลายวิธี สามารถสรุปได้ ดังนี้

เทคนิคของไหลเหนือจุดวิกฤติ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (supercritical fluid  $\text{CO}_2$ ), จากการเตรียมโครงร่างด้วยวิธีนี้ พอลิเมอร์จะละลายใน supercritical carbon dioxide เพื่อเกิดเฟสเดียวของพอลิเมอร์และสารละลายก๊าซ แล้วลดความดัน เพื่อเกิดความไม่เสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปสารละลายเป็นก๊าซ และทำให้เกิดผลของการเกิด nucleation และการโตของผลึกผลดังกล่าวทำให้เกิดรูพรุนภายในเมทริกซ์ของพอลิเมอร์ (ภาพที่ 18) จะได้โครงร่างเป็นวัสดุไมโครเซลล์ูลาร์โฟม (microcellular foam) ซึ่งมีรูพรุนในระดับไมโครเมตรและมีขนาดต่าง ๆ กันไป โดยมีตัวแปรที่สำคัญ คือ อุณหภูมิ ความดัน เวลาในการขึ้นรูป และเวลาที่ใช้ในการปล่อยก๊าซออก เพื่อควบคุมให้ขนาดของรูพรุนเหมาะสมที่สุด และการกระจายตัวของขนาดรูพรุนแคบลงให้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยโครงร่างที่ผลิตจาก PLA, PLGA และ PGA มักนิยมผลิตโดยวิธีนี้ ซึ่งส่วนใหญ่ใช้สำหรับการเลี้ยงเซลล์กระดูก

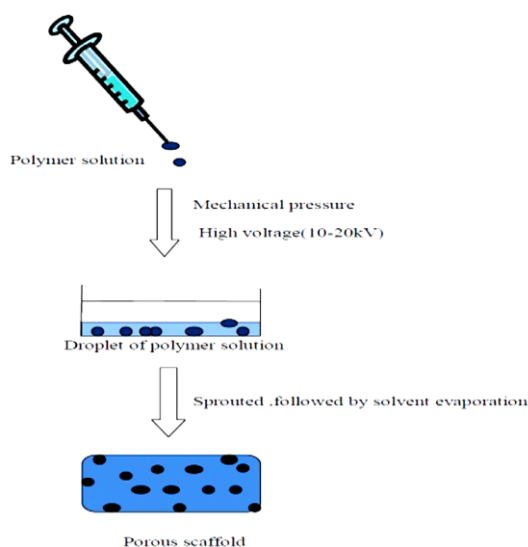


ภาพที่ 18 การเตรียมโครงร่างเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคของไหลเหนือจุดวิกฤติ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์

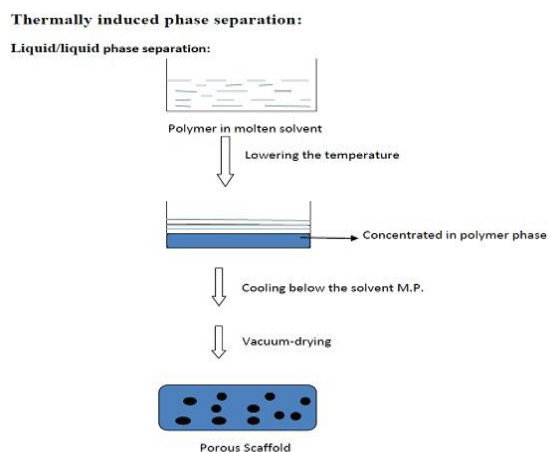
การเตรียมจากเส้นใยแล้วทำเป็นแผ่นผ้าแบบถักทอ หรือแบบไม่ถักทอ ซึ่งทำให้มีขนาดรูต่างกัน รวมทั้งมีการใช้เส้นใยขนาดนาโน (nanofibers) หรืออิเล็กโตรสปินนาโนไฟเบอร์ (electrospun nanofibers) ดังแสดงวิธีการเตรียมในภาพที่ 19 ซึ่งทำให้เส้นใยมีอัตราส่วนระหว่างพื้นผิวต่อปริมาตร (surface-to-volume ratio) สูงมากกว่า 1,000 เท่า เมื่อเทียบกับเส้นใยในระดับไมโครเมตร (Microfibers) มีน้ำหนักเบา แผ่นผ้าที่ได้จากเส้นใยนี้จะมีรูพรุนขนาดเล็กอยู่เป็นจำนวนมากทำให้มีการส่งผ่านของของเหลวหรือก๊าซได้ดีโดยมี

การผลิตจากเส้นใยของ PLA, PGA, PLGA, PCL, PHB, PVA รวมทั้งสามารถผลิตเส้นใยจากพอลิเมอร์ชีวภาพ เช่น ไคโตซาน ไฟโบรอิน เจลาติน กรดไฮยาลูโรนิก เป็นต้น (Matthews *et al.*, 2002 ; Zarkoob *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2004 ; Chuenjitkuntaworn *et al.*, 2010 ; Sahoo *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2011) ข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสสูง ทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะได้มากและทำให้ง่ายต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่อาจมีข้อเสียของโครงสร้างที่ไม่เสถียร ซึ่งมีการแก้ไขโดยใช้เทคนิค fiber bonding technique ซึ่งส่วนใหญ่ใช้สำหรับการเลี้ยงเซลล์กระดูก อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีนี้ไม่สามารถควบคุมให้มีโครงสร้างที่มีความพรุนละเอียดได้

เทคนิคการแยกเฟส (phase-separation) ด้วยการแยกพอลิเมอร์ที่ละลายในสารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกันไปเป็นเฟสที่มีประกอบไปด้วยเนื้อพอลิเมอร์และเฟสที่ไม่มีพอลิเมอร์ ด้วยการทำให้สารละลายเย็นลงต่ำกว่า binodal solubility curve หรือ ผสมตัวทำละลายอื่นที่เข้ากันไม่ได้ลงในสารละลายที่มีพอลิเมอร์ หลังจากนั้นตัวทำละลายจะถูกกำจัดออกไปด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze drying) และจะได้พอลิเมอร์ที่เป็นเนื้อโฟมมีรูพรุน (ภาพที่ 20) ขนาดของรูพรุนจะขึ้นกับเทคนิคการแยกเฟสระหว่างเฟสของเหลว-เฟสของเหลวหรือเฟสของแข็ง-เฟสของเหลว การควบคุมอุณหภูมิในการแยกเฟส ซึ่งแปรขนาดรูพรุนได้จาก 10-100 ไมโครเมตร ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้กับ PLA แล้วนำมาจุ่มกับอัลจิเนต หรือ คอลลาเจน สำหรับการเตรียมโครงร่างเลี้ยงเซลล์ของ PLA กับพอลิเมอร์ชีวภาพดังกล่าว สำหรับการเลี้ยงเซลล์กระดูก (Carfi-Pavia *et al.*, 2009)

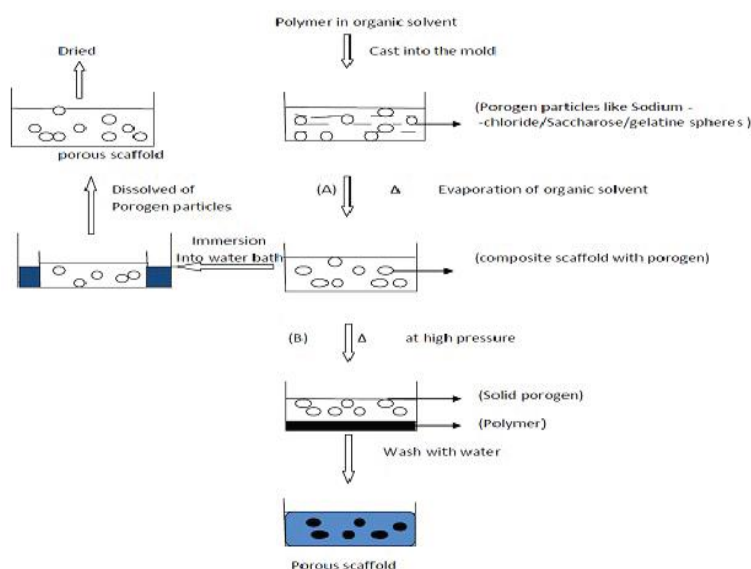


ภาพที่ 19 การเตรียมโครงร่างเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี electrospinning



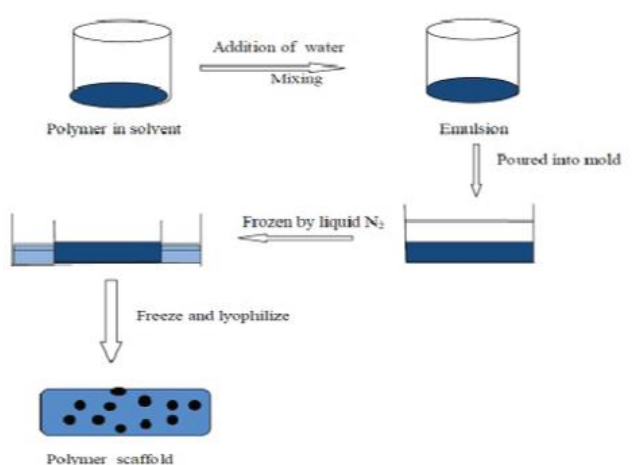
ภาพที่ 20 การเตรียมโครงร่างเลียงเซลล์ด้วยเทคนิคการแยกเฟส

เทคนิคการใช้สารสร้างรูพรุน (porogen leaching) ดังแสดงในภาพที่ 21 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผสมสารสร้างรูพรุนตามสัดส่วนที่เหมาะสมลงในสารละลายพอลิเมอร์ และนำไปขึ้นรูปตามต้องการ แล้วทำแห้ง หลังจากนั้นนำโครงร่างไปเผาไหม้หรือแช่ในน้ำเพื่อทำการชะล้างสารสร้างรูพรุนออกไป จะได้ขนาดรูพรุนตามสัดส่วนและขนาดของสารสร้างรูพรุนนั้น โดยไม่ขึ้นกับประเภทของสารสร้างรูพรุน หรือสารละลายที่ใช้ละลายพอลิเมอร์ การเลือกใช้สารสร้างรูพรุน ต้องคำนึงถึงการเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ ไม่เป็นพิษกับเนื้อเยื่อ มีคุณสมบัติในการละลายน้ำที่ดี สามารถสร้างรูพรุนที่มีขนาดเหมาะสมและคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อที่จะทำการศึกษา โดยทั่วไปมักใช้ เกลือ ประเภทโซเดียมคลอไรด์ โซเดียมทาร์เทรต โซเดียมซิเตรต และสารประเภทคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แป้ง เม็ดสาหร่าย ผงชูรส เป็นต้น งานวิจัยของ Prabarahan และคณะ (2007) ได้ใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเป็นสารควบคุมความพรุนในการเตรียมโครงร่างเลียงเซลล์กระดูกระหว่าง PLA กับไคโตซาน อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีนี้ไม่เหมาะกับการมีโปรตีนในโครงร่างเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนไปที่อุณหภูมิห้องได้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่รายงานสมบัติด้านฟิสิกส์และเคมีของโครงสร้างกระดูกเทียมที่ผลิตด้วยเทคนิคหล่อแบบ/กำจัดอนุภาค โดยใช้สารผสมระหว่างพอลิคาโพรแลกโตนและไฮดรอกซีแอลฟาไทด์ หรือระหว่างพอลิแลกติกแอซิด (PLA) และ HA วัสดุผสมทั้งสองชนิดจะใช้โซเดียมคลอไรด์เป็นสารสร้างรูพรุน พบว่าโครงสร้างมีการกระจายของรูพรุนอยู่อย่างสม่ำเสมอ สมบัติการชอบน้ำ/ไม่ชอบน้ำรวมทั้งความแข็งแรงของกระดูกเทียมจะขึ้นกับสัดส่วนของพอลิคาโพรแลกโตน หรือพอลิแลกติกแอซิดและไฮดรอกซีแอลฟาไทด์ อย่างไรก็ตามการใช้โซเดียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียวจะมีข้อจำกัดของการเชื่อมต่อของรูพรุน ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของกระดูกเทียม ดังนั้น Stylios และคณะ (2007) ได้ใช้สารพาราฟินควบคุมการเชื่อมต่อของรูพรุนแทน NaCl พบว่า พาราฟินให้การเชื่อมต่อของรูพรุนได้ดี และมีผนังรูพรุนที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลล์กระดูก



ภาพที่ 21 การเตรียมโครงร่างเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคการใช้สารสร้างรูพรุน

วิธีการแยกเฟสและการทำแห้งแบบ emulsion freeze-drying เป็นวิธีที่เตรียมได้เร็ว และทำให้มีความเป็นรูพรุนสูง และรูพรุนติดต่อกันได้ดี โดยมีวิธีการเตรียมดังแสดงในภาพที่ 22 ได้มีการนำมาใช้กับการสร้างโครงร่างเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบเนื่องจากทำที่อุณหภูมิต่ำ แต่อย่างไรก็ตามพบว่ายากที่จะควบคุมขนาดของรูพรุน และมักจะพบว่ามีขนาดใหญ่และเป็นรูเปิด ดังนั้นจึงมีการใช้วิธีการทำแห้งแบบแช่แข็งผสมกับการสร้างรูพรุนโดยใช้อนุภาคน้ำแข็งเป็นสารสร้างรูพรุน (Chen *et al.*, 2001) ข้อดีของวิธีนี้คือ ไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูง หรือการนำเอาสารที่ให้รูพรุนออกไป แต่มีข้อเสียคือ ใช้นเวลานาน และความเป็นรูพรุนไม่สม่ำเสมอ ขนาดของรูพรุนควบคุมได้ด้วยอัตราการแช่แข็งและ pH โดยที่อัตราการแช่แข็งเร็วทำให้เกิดรูพรุนเล็ก



ภาพที่ 22 การเตรียมโครงร่างเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการแยกเฟสและการทำแห้งแบบ emulsion freeze-drying

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินการวิจัย

##### 1. การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของนาโนเซลลูโลสจากชานอ้อย

กระบวนการเตรียมนาโนเซลลูโลสจากชานอ้อย สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ (1) การสกัดเซลลูโลสด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion) และกระบวนการฟอกขาว (Bleaching) ซึ่งจากกระบวนการดังกล่าว จะได้เซลลูโลสบริสุทธิ์ (Highly purified cellulose) จากนั้น (2) เซลลูโลสบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากชานอ้อย จะถูกลดขนาดให้อยู่ในระดับนาโนเมตร เรียกว่า นาโนเซลลูโลส (Nanocellulose) โดยการย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis) โดยกระบวนการเตรียมนาโนเซลลูโลส กล่าวโดยสรุป ดังนี้

ล้างชานอ้อยด้วยน้ำสะอาด เพื่อกำจัดดินและสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ จากนั้น อบแห้งด้วยตู้อบความร้อน (Hot air oven) จนตัวอย่างแห้ง หลังจากนั้น นำตัวอย่างชานอ้อยผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ ภายใต้ความร้อน 195 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้น ล้างตัวอย่างชานอ้อยที่ผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam-exploded fibers) ด้วยน้ำกลั่น และอบตัวอย่างให้แห้ง จากนั้น นำตัวอย่างฟอกขาว โดยการผสมตัวอย่างกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อน้ำ เท่ากับ 1 กรัมต่อ 20 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมคลอไรต์ (Sodium chlorite,  $\text{NaClO}_2$ ) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก และปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 4 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น (Glacial acetic acid) ทำปฏิกิริยาฟอกขาว ภายใต้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น เมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมง ให้เติมโซเดียมคลอไรต์และกรดอะซิติกปริมาณเท่าเดิมอีกครั้ง โดยกระทำซ้ำเช่นนี้ทุกชั่วโมง จนกว่าตัวอย่างจะมีสีขาว จากนั้น ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งค่าความเป็นกรดต่างเป็นกลาง และอบให้แห้ง จะได้เป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์

จากนั้น นำตัวอย่างเซลลูโลส ทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 64 โดยน้ำหนัก ภายใต้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 75 นาที จากนั้น กรองและล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น จนกระทั่งมีค่าความเป็นกรดต่างเป็นกลาง จะได้เป็นสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส จากนั้น ทำแห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง (Freeze-dry) โดยเซลลูโลสที่สกัดได้จากชานอ้อยนำมาศึกษาคุณสมบัติ ได้แก่

- ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างที่ผ่านแต่ละขั้นตอนการสกัด โดยวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีตามมาตรฐานของ The Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) ได้แก่ การวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส (T203 om-88) การวิเคราะห์หาปริมาณลิกนิน (T222 om-98) และปริมาณไฮโดรเซลลูโลส (โดยวิธี acid chlorite ของ Browning) (Kristiina *et al.*, 2011)

- ศึกษาสมบัติด้านสัณฐานวิทยาด้วย Scanning electron microscopy (SEM)
- ศึกษาหมู่ฟังก์ชันในเส้นใยด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)
- ศึกษาความเป็นผลึกด้วย X-ray Diffraction (XRD)
- ศึกษาความเสถียรต่อความร้อนของเส้นใยด้วย Thermogravimetric analysis (TGA)

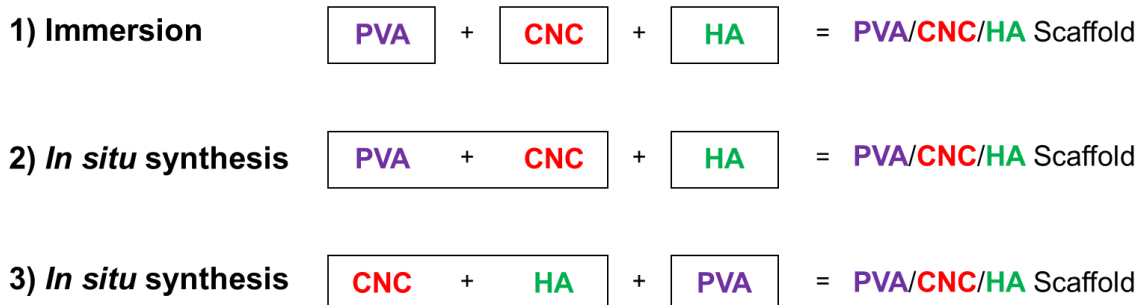
## 2. การเตรียมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์

ผงอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (อัตราส่วนระหว่าง Ca/P เท่ากับ 1.67) สามารถเตรียมได้จากแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) และ กรดฟอสฟอริก ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) โดยวิธีการตกตะกอน โดยหยดสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ด้วยอัตรา 6 มิลลิลิตรต่อนาที ในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ละลายในน้ำปราศจากไอออน ภายใต้การกวน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยปรับพีเอชให้คงที่ที่พีเอช 8 ตลอดการ ทำปฏิกิริยาดำเนินการด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ซึ่งจะเกิดการตกตะกอนที่สมบูรณ์ หลังจากนั้นปล่อยให้ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงโดยที่ไม่มีการกวน ทำการล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนแล้วกรองเอาตะกอนจากสารละลาย นำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำผงที่แห้งมาบดและกรองผ่านตะแกรงคัดขนาด ขนาด 74 ไมโครเมตร (200 mesh) (Zadegan *et al.*, 2011)

วิเคราะห์ผงขนาดนาโนของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ โดยศึกษาสมบัติด้านสัณฐานวิทยาด้วย Scanning electron microscopy ( SEM ) ศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy) ศึกษาความเป็นผลึกด้วย X-ray Diffraction (XRD)

## 3. การศึกษาวิธีผสม และขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์

กระบวนการผสมและขึ้นรูปเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการเตรียมโครงสร้างเซลล์ และต้องสามารถทำให้อนุภาคนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์สามารถกระจายตัวได้อย่างสมบูรณ์ในเนื้อของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ซึ่งการกระจายตัวของทั้งสองอนุภาคนี้นี้ จะมีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติและคุณภาพของโครงสร้างเซลล์ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นศึกษากระบวนการผสมและขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์ 3 กระบวนการ คือ (1) การแช่ (Immersion) โครงสร้างเซลล์ในสารแขวนลอยอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (2) การสังเคราะห์แบบโดยตรง (*In situ* synthesis) ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ในโครงสร้างเซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลส และ (3) การสังเคราะห์แบบโดยตรงของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสก่อนการผสมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โดยรายละเอียดกระบวนการผสมและขึ้นรูปของโครงสร้างเซลล์ทั้ง 3 กระบวนการสรุปดังภาพที่ 23 โดยจะกล่าวโดยละเอียดในหัวข้อถัดไป

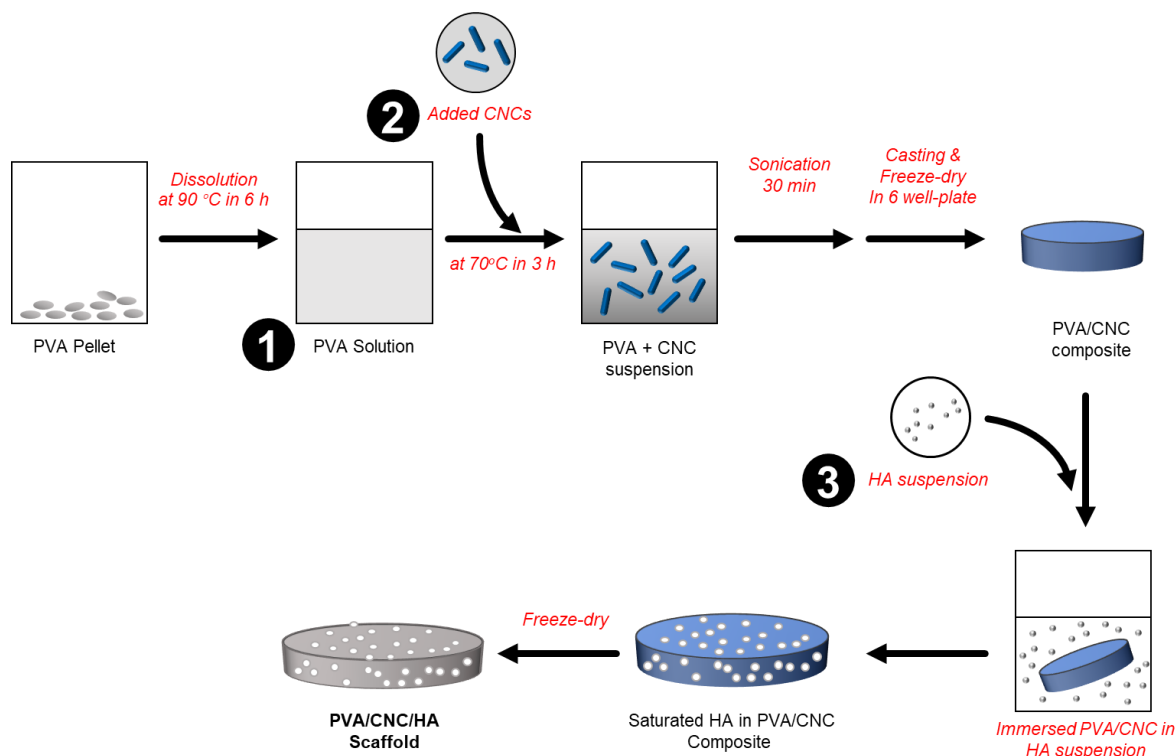


ภาพที่ 23 แผนภาพสรุปการออกแบบกระบวนการผสมและขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ นาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต

### 3.1 การแช่ (Immersion) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลส ในสารแขวนลอยอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต

กระบวนการผสมและขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยการแช่ จะเป็นการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และผสมกับสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสก่อน จากนั้น จึงนำไปแช่ในสารแขวนลอยอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต แสดงดังภาพที่ 24 กล่าวโดยสรุป ดังนี้

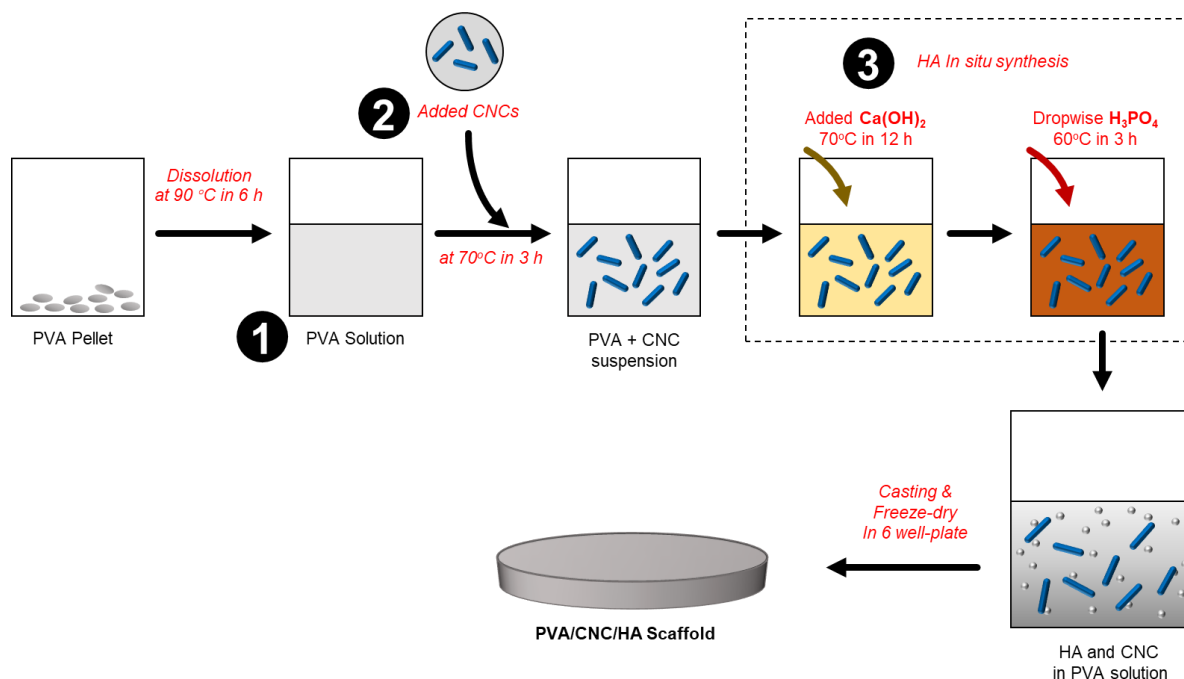
ละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักในน้ำกลั่น ภายใต้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้น นำสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่เตรียมไว้ด้วยวิธีการย่อยด้วยกรด (ในข้อ 1) ผสมให้เข้ากัน เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น ขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการเทสารละลายดังกล่าวในแม่พิมพ์พลาสติกชนิด 6-well plate และทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) จะได้ โครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลส จากนั้น นำโครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว แช่ในสารแขวนลอยอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ภายใต้เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ ณ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำแห้งตัวอย่างอีกครั้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จะได้โครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต แสดงดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 การแช่พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลส ในสารแขวนลอยอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์

### 3.2 การสังเคราะห์แบบโดยตรง (*In situ synthesis*) ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ในโครงเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลส

กระบวนการผสมและขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว จะเป็นการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และผสมกับสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสก่อน (เช่นเดียวกับกระบวนการในข้อ 3.1) แต่จะแช่โครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในสารละลายที่ใช้สังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์แบบโดยตรง (*In situ synthesis*) เพื่อเป็นการพัฒนาการกระจายตัวของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ โดยตั้งสมมุติฐานว่า สารตั้งต้นจะกระจายเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ และเกิดเป็นอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ได้ทั่วในโครงเลี้ยงเซลล์ โดยกระบวนการเตรียมโดยสรุป แสดงดังภาพที่ 25

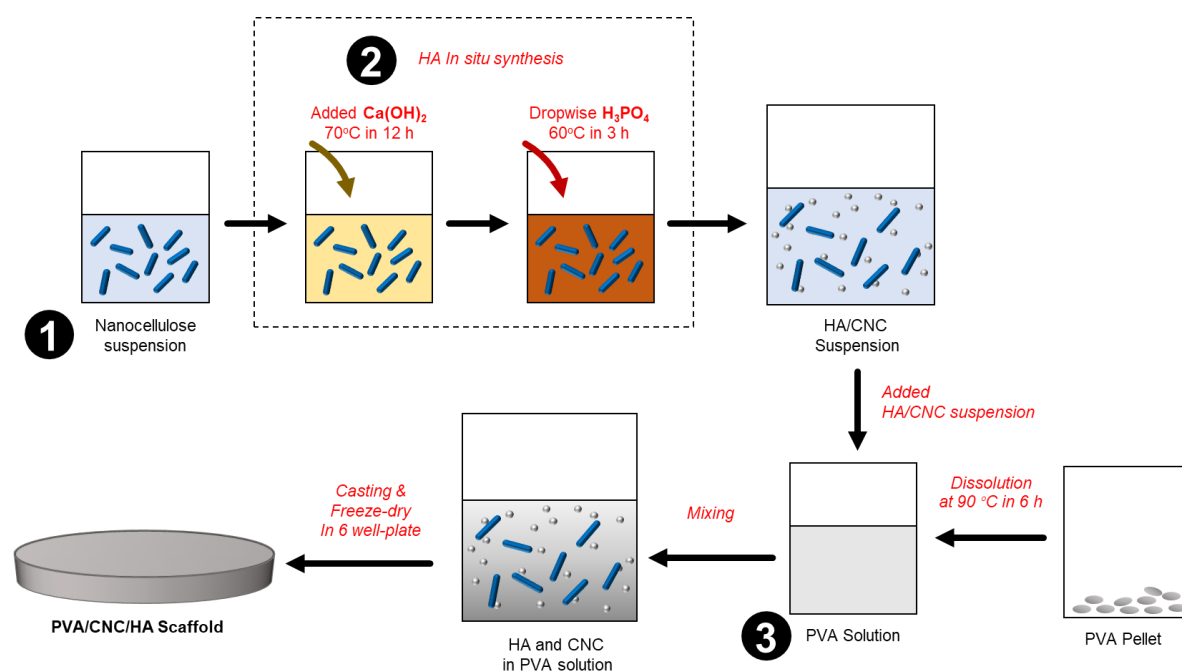


ภาพที่ 25 การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตแบบ *In situ* synthesis

การผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการสังเคราะห์ อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต (*In situ* synthesis) ละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ภายใต้การกวนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสารละลายนาโนเซลลูโลสที่สกัดได้จากขานอ้อยกวนผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใส่สารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ภายใต้การกวน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยดสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ กวนสารละลายให้ผสมกันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยปรับพีเอชให้คงที่ในช่วงระหว่างพีเอช 10-11 ตลอดการทำปฏิกิริยาด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ หลังจากนั้นปล่อยให้ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงโดยที่ไม่มีการกวนที่อุณหภูมิห้องนำไปเทใส่แม่พิมพ์พลาสติกชนิด 6-well plate โดยใส่ช่องละ 5 มิลลิลิตร และนำไปแช่แข็งที่ -40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำไปทำแห้ง ด้วยวิธีการทำแห้งโดยแช่เยือกแข็ง (freeze dry) จนแห้ง แสดงดังภาพที่ 25

### 3.3 การสังเคราะห์แบบโดยตรง (*In situ* synthesis) ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส และผสมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ขึ้นรูปโครงสร้างเซลล์

นำสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต โดยเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส จากนั้น ผสมให้เข้ากันภายใต้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น หยดสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ และผสมให้เข้ากันภายใต้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 การผลิตโครงสร้างเซลล์ร่วมกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตแบบ *In situ* synthesis

### 3. ศึกษาลักษณะทางกายภาพและลักษณะสัณฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้

นำโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้มาศึกษาลักษณะทางกายภาพและลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

- **ลักษณะสัณฐานวิทยา** ของชิ้นตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง scanning electron microscope (SEM)(XL Series, XL30, Philips, The Netherlands) ที่ 10 KV

- **สมบัติความเป็นรูพรุน (porosity)** ด้วยวิธีการแทนที่ของของเหลว ตามวิธีดัดแปลงของ Kim และคณะ (2005) ด้วยการวัดการแทนที่ของของเหลวในรูพรุนของโครงร่าง ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้แอลกอฮอล์เป็นของเหลวที่ใช้แทนที่โครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งไม่ทำให้เมตริกซ์ของโครงร่างเกิดการพองตัวหรือหดตัว โดยการชั่งน้ำหนักของชิ้นตัวอย่างแห้ง (W1) แล้วแช่ในแอลกอฮอล์ ที่ปริมาตร 4 ml (V1) ในกระบอกตวง ทิ้งไว้นาน 5 นาที แล้วนำตัวอย่างโครงเลี้ยงที่ชุ่มด้วยแอลกอฮอล์ออกมาชั่งน้ำหนักทันที (W2) อ่านค่าปริมาตรของ ที่เหลือในกระบอกตวง (V2) สำหรับปริมาตรทั้งหมดของโครงเลี้ยงเซลล์คิดจาก V1-V2 สำหรับปริมาตรรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์คิดจากปริมาตรของแอลกอฮอล์ที่เหลือในโครงเลี้ยงเซลล์ ด้วยการคิดจากสัดส่วนของน้ำหนักของแอลกอฮอล์ที่เหลือในโครงเลี้ยงเซลล์ และความหนาแน่นของแอลกอฮอล์ ( $\rho_E$ ) คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ของความเป็นรูพรุนจากสมการที่ 1

$$\% \text{ Porosity} = [(W1 - W2)/\rho_E]/(V1 - V2) \times 100 \quad \text{สมการที่ 1}$$

- **สมบัติทางเชิงกล** ด้วย compression test ตามวิธี ASTM-F451-95 ด้วยเครื่อง Texture Profile Analyzer (TAX TEE 32, M/s Stable Microsystems, Surrey, UK) ที่ความเร็ว 0.03 mm/min ด้วยการ ใช้ probe ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm และใช้โหมด compression เพื่อกดชิ้นตัวอย่างลงไป 75% ของ strain วัดจำนวน 10 ชิ้นตัวอย่าง

- **โครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์** ด้วยเครื่อง ATR-FTIR spectrometer (Thermo Nicolet 380, Thermo Electron Corporation, USA) ด้วยเทคนิค Micro-ATR ความยาวคลื่น 4000-600  $\text{cm}^{-1}$

- **ค่าการพองตัว (swelling ratio) และค่า water uptake** ของน้ำ ตามวิธีของ Siritienthong และคณะ (2012) โดยการนำตัวอย่างอบที่อุณหภูมิ 65°C ทิ้งไว้ 1 คืน ทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (Wd) แล้วนำไปแช่ในน้ำทิ้งไว้ 24 ชม. ตัวอย่างที่ได้นำมาชั่งน้ำหนักส่วนเกินด้วยกระดาษทิชชู แล้วชั่งน้ำหนัก (Ws) คำนวณค่าดังนี้

$$\text{Swelling ratio} = (Ws - Wd)/Wd \quad \text{สมการที่ 2}$$

$$\text{Water uptake (\%)} = [(Ws - Wd)/(Ws)] \times 100 \quad \text{สมการที่ 3}$$

#### 4. การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงร่างเลี้ยงเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) เป็นวิธีทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างโครงร่างเลี้ยงเซลล์ กับเซลล์ผิวหนังของหนู และการนับจำนวนเซลล์เป็นการทดสอบการเจริญของเซลล์ บ่มในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีส่วนผสม FBS ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ Penicilin-Streptomycin ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยบ่มเป็นระยะเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมเป็น conditioned media (CM) จากนั้นจึงเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง (fibroblasts) ในภาตหลุมชนิด 12-well tissue culture plate เมื่อเซลล์เกาะยึดและแผ่ตัวบนพื้นผิวภาตหลุมเป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แบบปกติเป็นแบบ CM หลังการบ่มเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 แล้วจึงใช้สีย้อมชนิด live-dead fluorescence dye ย้อมเซลล์ เซลล์ที่ยังมีชีวิตจะเรืองแสงสีเขียว ส่วนเซลล์ที่ตายจะเรืองแสงสีแดง ดังนั้นการย้อมด้วยวิธี live-dead assay นี้จึงสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ว่ามีสารที่ก่อพิษหลุดออกจากตัวอย่างหรือไม่ เปลี่ยน CM ทุกวันด้วย fresh CM และย้อมนิวเคลียสเซลล์ด้วย biz-Benzamide และนับจำนวนเซลล์ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นอกจากนี้ยังทดสอบการเจริญของเซลล์กระดูกบนโครงร่างเลี้ยงเซลล์ โดยเคลือบพื้นผิวโครงร่างเลี้ยงเซลล์ด้วยเจลาตินเพื่อกระตุ้นการยึดเกาะของเซลล์ ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงบนโครงร่างเลี้ยงเซลล์ ย้อมสีเซลล์ด้วย calcein AM เพื่อวิเคราะห์การแผ่ตัวของเซลล์บนโครงร่างต่อไป และเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์บนโครงร่างที่ได้มาจากการเตรียมที่แตกต่างกัน

## บทที่ 4

### ผลการศึกษาและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้ สามารถแบ่งออกเป็นสามส่วน ได้แก่ (1) การเตรียมนาโนเซลลูโลสจากขานอ้อย และอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (2) การศึกษาการสังเคราะห์ และกระบวนการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ 3 กระบวนการ และ (3) การศึกษาคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์จากกระบวนการต่างๆที่เตรียมได้ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ทดสอบ เพื่อหากระบวนการที่เหมาะสมและดีที่สุดในการเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยการพิจารณาจากคุณสมบัติต่าง ๆ

#### 1. การเตรียมนาโนเซลลูโลส และอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ และการศึกษาคุณสมบัติที่เตรียมได้

ในส่วนการวิจัยส่วนหนึ่งของงานวิจัย คือ การเตรียมนาโนเซลลูโลสที่สกัดได้จากขานอ้อยโดยอาศัยกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ ฟอกขาว และการย่อยด้วยกรด ตามลำดับ และกระบวนการเตรียมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ และศึกษาคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่เตรียมได้ เพื่อใช้ข้อมูลดังผลการวิจัยดังกล่าวใช้ในการประเมินศักยภาพของกระบวนการเตรียมนาโนเซลลูโลสจากขานอ้อย รวมทั้งคุณสมบัติของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ โดยรายละเอียดและผลการวิจัย แสดงดังต่อไปนี้

##### 1.1 การสกัดเซลลูโลสจากขานอ้อย การเตรียมนาโนเซลลูโลส และการศึกษาคุณสมบัติ

###### 1.1.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (chemical composition) ของตัวอย่างเส้นใยที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการสกัดเซลลูโลสตามมาตรฐาน Technical Association of Pulp and Paper Industry standard (TAPPI) Standard

งานวิจัยนี้ใช้ขานอ้อยเป็นแหล่งของเซลลูโลสโดยอาศัยกระบวนการสกัด 2 ขั้นตอน ได้แก่ (1) การระเบิดด้วยไอน้ำและ (2) การฟอกขาว ตามลำดับ โดยศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการสกัดตามวิธีมาตรฐาน TAPPI แสดงดังตารางที่ 6 จากผลการทดลอง พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของขานอ้อยดิบหรือขานอ้อยที่มีปริมาณเซลลูโลสสูงร้อยละ 42.05 และมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินร้อยละ 26.82 และ 19.61 ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ขานอ้อยมีปริมาณเซลลูโลสสูง ซึ่งเหมาะสมแก่การนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการสกัดเซลลูโลส จากนั้น เมื่อขานอ้อยผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ พบว่าปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลดลง โดยลดลงคิดเป็นร้อยละ 50.64 และ 37.12 ตามลำดับ (ปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เท่ากับร้อยละ 13.24 และ 12.33 ตามลำดับ) เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิ

เซลลูโลสเป็นสารประกอบน้ำตาลต่างเพนโทสและน้ำตาลเฮกโซส ซึ่งสามารถถูกทำลายหรือไฮโดรไลซ์ภายใต้ อุณหภูมิและความดันสูงในระหว่างการระเบิดด้วยไอน้ำ ดังนั้น เมื่อชานอ้อยผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ แล้ว (Steam-exploded fibers) พบว่าปริมาณเซลลูโลสในตัวอย่างเพิ่มสูงขึ้น เท่ากับร้อยละ 66.67 จากนั้น เส้นใยที่ผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำจะถูกฟอกขาวด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรต์ (Sodium chlorite,  $\text{NaClO}_2$ ) เพื่อกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่เหลืออยู่ในตัวอย่าง จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อตัวอย่างผ่านการฟอกขาว (bleached fibers) ปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลดลงร้อยละ 59.24 และ 94.64 ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณเซลลูโลสในตัวอย่างเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 83.20 เนื่องจากสารละลายคลอไรต์ (ในสภาวะกรด) จะสามารถออกซิไดส์สารประกอบอะโรมาติกจำพวกลิกนิน (Aromatic compounds) ได้ (Zuluaga *et al.*, 2009) ในขณะที่เซลลูโลสไม่ถูกทำลายในสภาวะดังกล่าว โดยเมื่อตัวอย่างผ่านกระบวนการฟอกขาวแล้ว มี ผลได้มากถึง ร้อยละ 58 จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า ชานอ้อยมีปริมาณเซลลูโลสเป็น ส่วนประกอบสูงและเหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งของเซลลูโลส และกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำและการ ฟอกขาวสามารถสกัดเซลลูโลสได้

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการสกัดเซลลูโลสในขั้นตอนต่างๆ

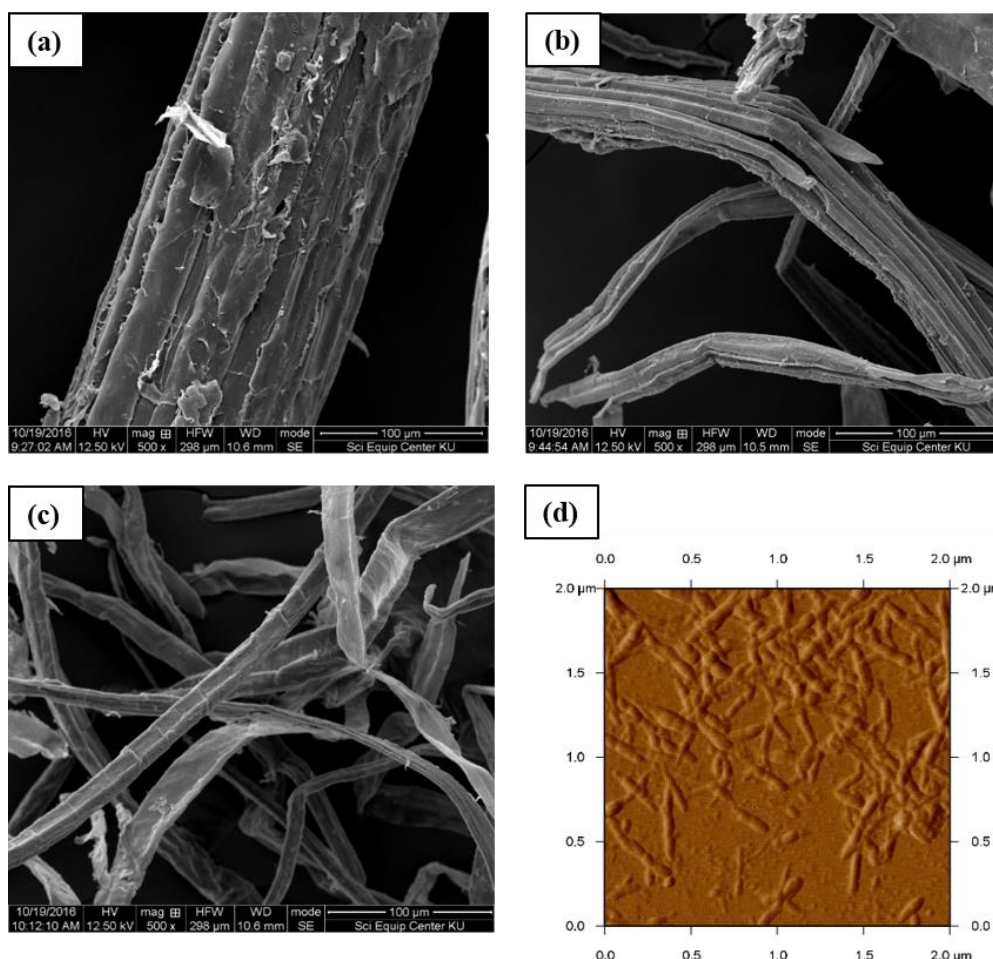
| Sample                | Lignin<br>(%)    | Hemicellulose<br>(%) | $\alpha$ -cellulose<br>(%) | Yield<br>(%)     |
|-----------------------|------------------|----------------------|----------------------------|------------------|
| SCB untreated fibers  | 19.61 $\pm$ 0.73 | 26.82 $\pm$ 0.45     | 42.05 $\pm$ 0.23           | 100              |
| Steam-exploded fibers | 12.33 $\pm$ 0.23 | 13.24 $\pm$ 0.22     | 66.67 $\pm$ 0.99           | 60.26 $\pm$ 1.60 |
| Bleached fibers       | 1.05 $\pm$ 0.04  | 10.93 $\pm$ 0.27     | 83.20 $\pm$ 0.25           | 58.84 $\pm$ 0.95 |

หมายเหตุ SCB คือ ชานอ้อยที่ยังไม่ผ่านกระบวนการสกัด  
 Steam-exploded fibers คือ ชานอ้อยที่ผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ  
 Bleached fibers คือ ชานอ้อยที่ผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำและฟอกขาว

### 1.1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

จากภาพที่ 27 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยที่ผ่านกระบวนการสกัดในขั้นตอนต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy) จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเปลี่ยนแปลงเมื่อผ่านกระบวนการสกัดในขั้นตอนต่างๆ จากภาพที่ 27a แสดงพื้นผิวของเส้นใยชานอ้อยที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัด พื้นผิวเรียบเนื่องจากประกอบด้วย พอลิแซคคาไรด์ (Mandal and Chakrabarty, 2011). ในขณะที่เมื่อเส้นใยผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ พบว่า พื้นผิวของเส้นใยขรุขระมากขึ้น (ภาพที่ 27b) เนื่องจากการที่เฮมิเซลลูโลสและลิกนินบางส่วนถูกกำจัด

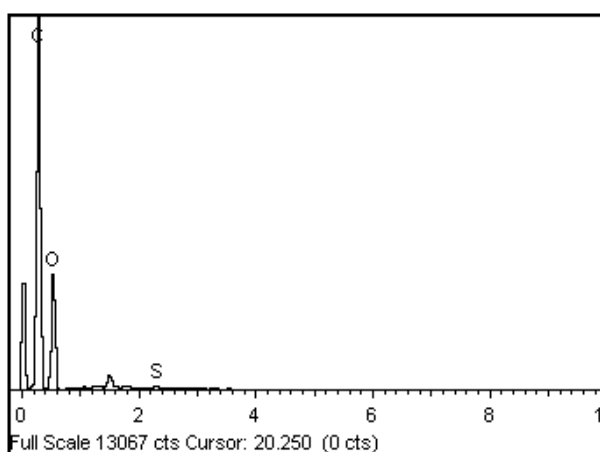
ไปในระหว่างกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ จากนั้น เมื่อเส้นใยถูกฟอกขาว พบว่า เส้นใยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-20 ไมโครเมตร (ภาพที่ 27c) (Mandal and Chakrabarty, 2011; Slavutsky and Bertuzzi, 2014; Sun *et al.*, 2004) จากนั้น ตัวอย่างเซลลูโลส (หรือเส้นใยที่ผ่านกระบวนการฟอกขาว) จะถูกย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น โดยส่วนอสัณฐาน (Amorphous region) ถูกไฮโดรไลซ์ เหลือเพียงส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline region) ซึ่งมีขนาดเล็กระดับนาโนเมตร โดยเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยนาโนเซลลูโลสที่เตรียมได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแรงอะตอม (Atomic force microscopy) แสดงภาพที่ 1d พบว่า ลักษณะของเส้นใยนาโนเซลลูโลสเป็นท่อนสั้น โดยมีความยาวและเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 500-550 และ 52-54 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยมีค่า aspect ratio (L/d) เท่ากับ 10 (Kumar *et al.*, 2014)



ภาพที่ 27 ลักษณะตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของชานอ้อยที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัด (a), เส้นใยชานอ้อยที่ผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ (b), เส้นใยชานอ้อยที่ผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำและฟอกขาว (c) และลักษณะของตัวอย่างเส้นใยนาโนเซลลูโลสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแรงอะตอม (d)

### 1.1.3 การศึกษาองค์ประกอบของธาตุในตัวอย่างเส้นใยนาโนเซลลูโลส

เนื่องจากการเตรียมนาโนเซลลูโลสอาศัยกระบวนการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ดังนั้นจึงจำเป็นในการติดตามการปนเปื้อนของกรดซัลฟิวริกในตัวอย่างโดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุด้วยเครื่อง EDX จึงมีความจำเป็น เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างเส้นใยนาโนเซลลูโลสที่เตรียมได้ ปราศจากโมเลกุลกรด โดยผลการทดลองจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง EDX แสดงดังภาพที่ 28 แสดงองค์ประกอบของธาตุในตัวอย่างเส้นใยนาโนเซลลูโลส เพื่อศึกษาหาปริมาณของหมู่ซัลเฟตที่ไม่ต้องการให้หลงเหลืออยู่ในโครงสร้างของนาโนเซลลูโลส จากภาพที่ 28 แสดงพีคสำคัญ ได้แก่ พีคของคาร์บอน ออกซิเจนและซัลเฟอร์ โดยพบว่าเส้นใยนาโนเซลลูโลสที่เตรียมได้ประกอบด้วยคาร์บอนและออกซิเจน เท่ากับร้อยละ 60.68 และ 39.22 ตามลำดับ ในขณะที่พบซัลเฟอร์เพียงร้อยละ 0.09 (ตารางที่ 7) ซึ่งเกิดจากกระบวนการ sulfonation ในระหว่างกระบวนการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก



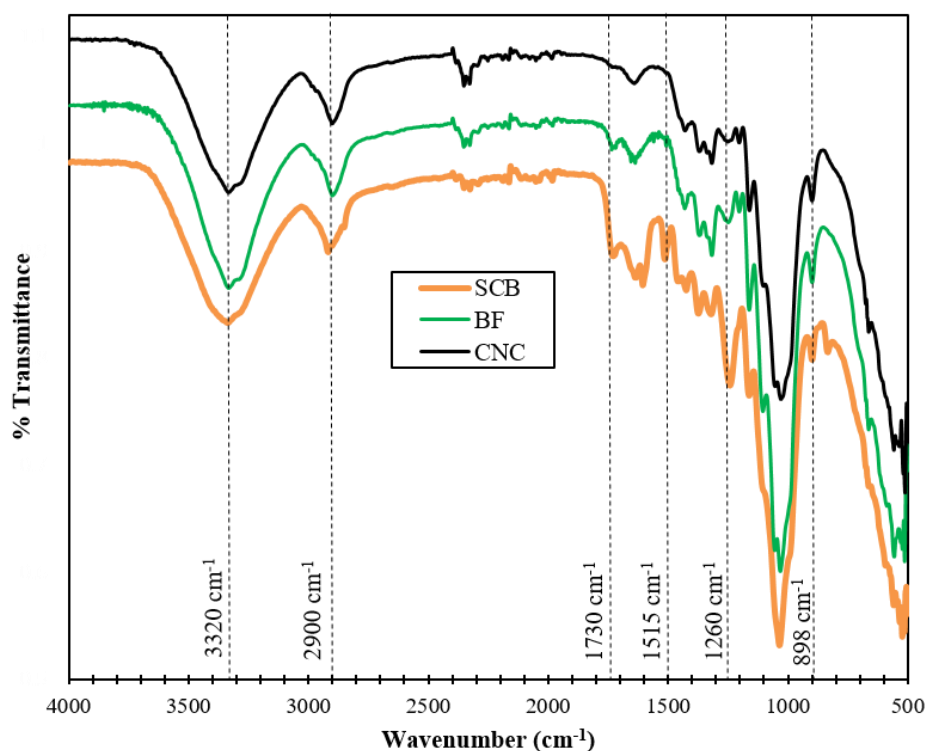
ภาพที่ 28 ลักษณะเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างนาโนเซลลูโลสจากเครื่อง EDX

ตารางที่ 7 ปริมาณธาตุ (Element component) ของตัวอย่างนาโนเซลลูโลส

| Elements | Weight (%)  | Atomic (%) |
|----------|-------------|------------|
| C K      | 53.62 ± 0.3 | 60.68      |
| O K      | 46.16 ± 0.3 | 39.22      |
| S K      | 0.22 ± 0.03 | 0.09       |
| Total    | 100         |            |

#### 1.1.4 วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

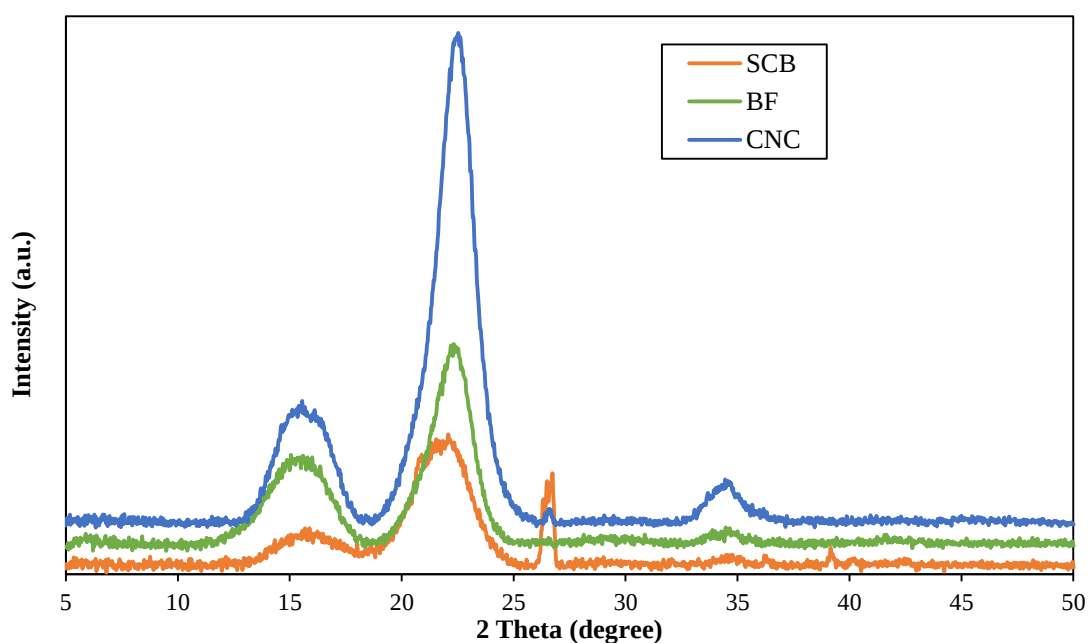
เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีใช้เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างกระบวนการสกัด แสดงดังภาพที่ 29 พบว่า ในขณะที่เส้นสเปกตรัมของทุกตัวอย่างแสดงพีคในช่วง  $3500-3200$  และ  $2918\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งหมายถึงหมู่ไฮดรอกซิลรูปและ C-H stretching ในโครงสร้างของเซลลูโลสตามลำดับ (Khalil *et al.*, 2001). เส้นสเปกตรัมของทุกตัวอย่างแสดงพีคที่ความยาวคลื่น  $1737\text{ cm}^{-1}$  โดยหมายถึง พันธะ C=O stretching vibration ของหมู่เอซิดิล พันธะอีเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกและคีโตนที่พบในเอมิเซลลูโลส (Li *et al.*, 2014) โดยพีคดังกล่าวมีแนวโน้มลดลงในระหว่างการสกัดและไม่แสดงในเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างเส้นใยนาโนเซลลูโลส ในขณะที่พีคที่ความยาวคลื่น  $1514$  และ  $1606\text{ cm}^{-1}$  หมายถึง พันธะ C-C ในวงอะโรมาติกที่พบในโครงสร้างลิกนิน ซึ่งพีคดังกล่าวจะไม่พบในเส้นสเปกตรัมของเส้นใยที่ผ่านการฟอกขาวและเส้นใยนาโนเซลลูโลส เนื่องจากการที่ลิกนินและเอมิเซลลูโลสถูกกำจัดออกไปในระหว่างกระบวนการสกัดเซลลูโลส (Garside and Wyeth, 2003; Wang *et al.*, 2010) โดยพีคที่ความยาวคลื่น  $1249\text{ cm}^{-1}$  ที่แสดงในเส้นสเปกตรัมของขานอ้อยที่ยังไม่ผ่านการสกัดมีแนวโน้มลดลงในระหว่างกระบวนการสกัด แสดงถึงพันธะ C-O ในโครงสร้างของลิกนิน จากผลการทดลองดังกล่าว สามารถยืนยันได้ว่า การสกัดเซลลูโลสด้วยกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำและฟอกขาว สามารถกำจัดเอมิเซลลูโลสและลิกนินจากตัวอย่างได้



ภาพที่ 29 แสดงเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างขานอ้อยที่ผ่านการสกัด (SCB), ตัวอย่างที่ผ่านการฟอกขาว (BF) และตัวอย่างเส้นใยนาโนเซลลูโลส (CNC)

### 1.1.5 วิเคราะห์โครงสร้างทางผลึกด้วยเครื่องวัดการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์

การศึกษารูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของทุกตัวอย่างแสดงพีกสำคัญ  $2\theta = 16$  และ  $22.5$  องศา แสดงดังภาพที่ 30 เป็นลักษณะผลึกของเซลลูโลส (Cellulose I polymorphs) (Klemm *et al.*, 2005) เนื่องจากทุกตัวอย่างประกอบด้วยเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ทำให้แสดงลักษณะพีกสำคัญของเซลลูโลส นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเป็นผลึก (crystallinity index) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการสกัดในแต่ละขั้นตอน แสดงดังตารางที่ 8 เนื่องจากส่วนที่เป็นอสัณฐาน (Amorphous regions) ในตัวอย่างถูกกำจัดออกในระหว่างกระบวนการสกัดและย่อยด้วยกรด คงเหลือเพียงส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline regions) (Azizi Samir *et al.*, 2004)



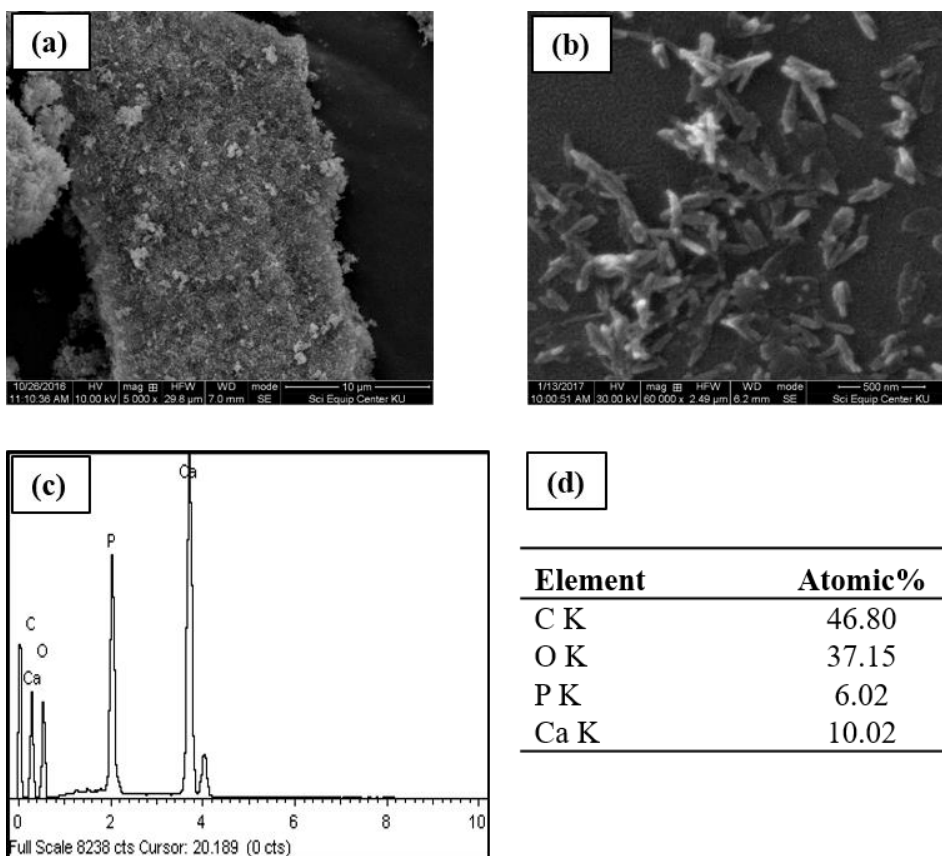
ภาพที่ 30 ลักษณะรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนการสกัด

ตารางที่ 8 ค่าดัชนีความเป็นผลึกของตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนการสกัด

| Sample                | Crystallinity Index (%CrI) |
|-----------------------|----------------------------|
| SCB untreated fibers  | $33.85 \pm 0.78$           |
| Bleached fiber        | $51.30 \pm 0.53$           |
| Cellulose nanocrystal | $71.49 \pm 0.36$           |

## 1.2 การเตรียมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

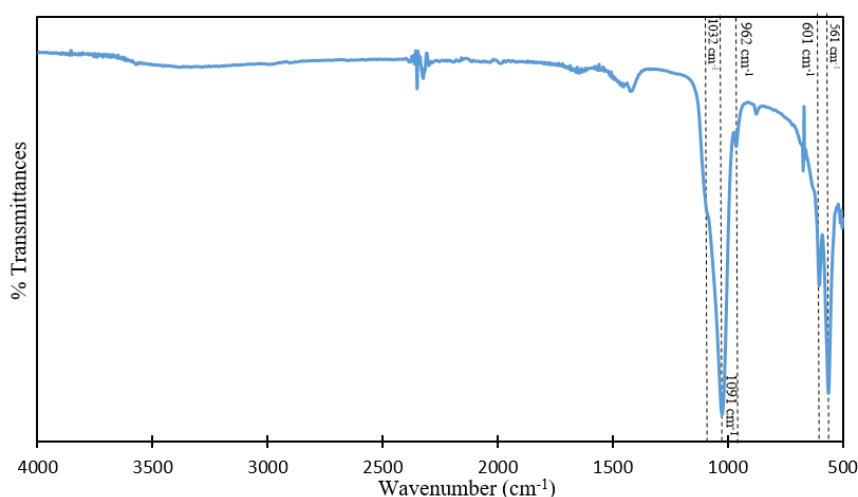
จากภาพที่ 31 แสดงลักษณะของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นว่าอนุภาคที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นท่อนเล็กสั้น คล้ายเข็ม โดยมีขนาด 200-500 นาโนเมตร (ภาพที่ 31a และ 31b) นอกจากนี้ จากการศึกษาองค์ประกอบของธาตุด้วยเครื่องมือ EDS (แสดงดังภาพที่ 31c) พบว่า แสดงพิกัดสำคัญของแคลเซียมและฟอสฟอรัสซึ่งเป็นธาตุองค์ประกอบหลักในอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ โดยสัดส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสมีค่าเท่ากับ 1.67 ซึ่งเป็นค่าสัดส่วนของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่พบได้ทั่วไป (ค่าประมาณ 1.5-1.85) จากสัดส่วนของแคลเซียมและฟอสฟอรัสดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่า วิธีดังกล่าวสามารถเตรียมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ได้



ภาพที่ 31 แสดงลักษณะของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(6a-b) และผล EDS ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (6c-d)

### 1.3 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรโกปี

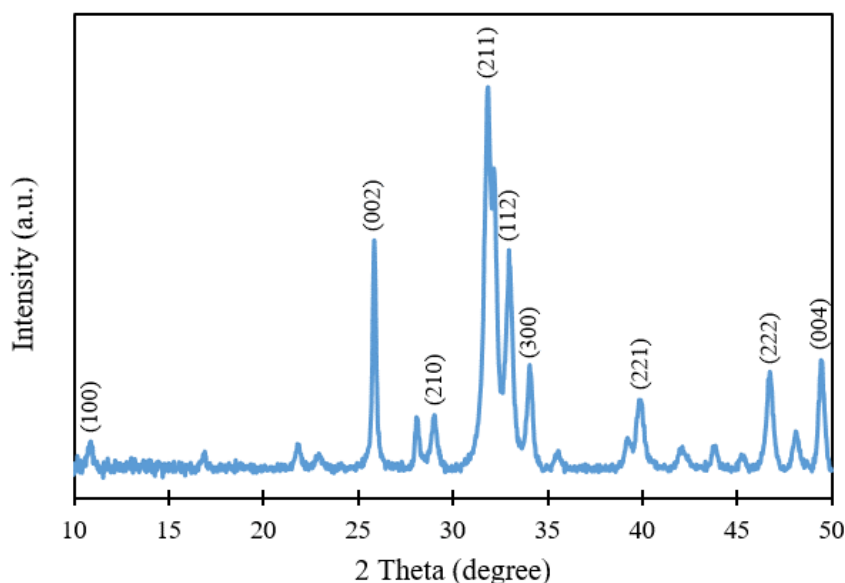
ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่เตรียมได้ แสดงดังภาพที่ 32 จากผลการทดลองพบว่า เส้นสเปกตรัมของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์แสดงพีกสำคัญของแคลเซียมฟอสเฟต ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารประกอบจำพวกไฮดรอกซีแอพาไทต์ โดยเส้นสเปกตรัมแสดงพีกสำคัญที่เลขคลื่น เท่ากับ  $962$ ,  $1091$  และ  $1032\text{ cm}^{-1}$  และแสดงพีกสำคัญที่เกี่ยวกับองค์ประกอบของหมู่ฟอสเฟตในโครงสร้างของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ที่เลขคลื่นเท่ากับ  $604$  และ  $561\text{ cm}^{-1}$  โดยจากผลการศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรโกปีดังกล่าว สามารถยืนยันได้ว่า วิธีและกระบวนการสังเคราะห์ในการทดลอง สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ได้ และไม่มี การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของไฮดรอกซีแอพาไทต์



ภาพที่ 32 แสดงเส้นสเปกตรัมของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์

### 1.4 การศึกษาโครงสร้างผลึกของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ด้วยเครื่องวัดการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์

การศึกษาโครงสร้างทางผลึกของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์และวัดรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ด้วยเครื่องเอ็กซ์เรย์ดิฟเฟกชัน แสดงดังภาพที่ 8 จากผลการทดลองพบว่า อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์แสดงพีกสำคัญของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ คือพีก  $2\theta$  เท่ากับ  $11$ ,  $26.5$ ,  $29$ ,  $33.5$ ,  $34$ ,  $40$ ,  $42.5$  และ  $44.5$  องศา ซึ่งแสดงรูปแบบผลึก (lattice structure) เท่ากับ  $(1\ 0\ 0)$ ,  $(0\ 0\ 2)$ ,  $(2\ 1\ 0)$ ,  $(2\ 1\ 1)$ ,  $(1\ 1\ 2)$ ,  $(3\ 0\ 0)$ ,  $(2\ 2\ 1)$ ,  $(2\ 2\ 2)$  และ  $(0\ 0\ 4)$  ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าว พีกทั้งหมดแสดงถึงลักษณะที่ถูกต้องของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ที่ได้จากการเตรียมในห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 33 ลักษณะรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์

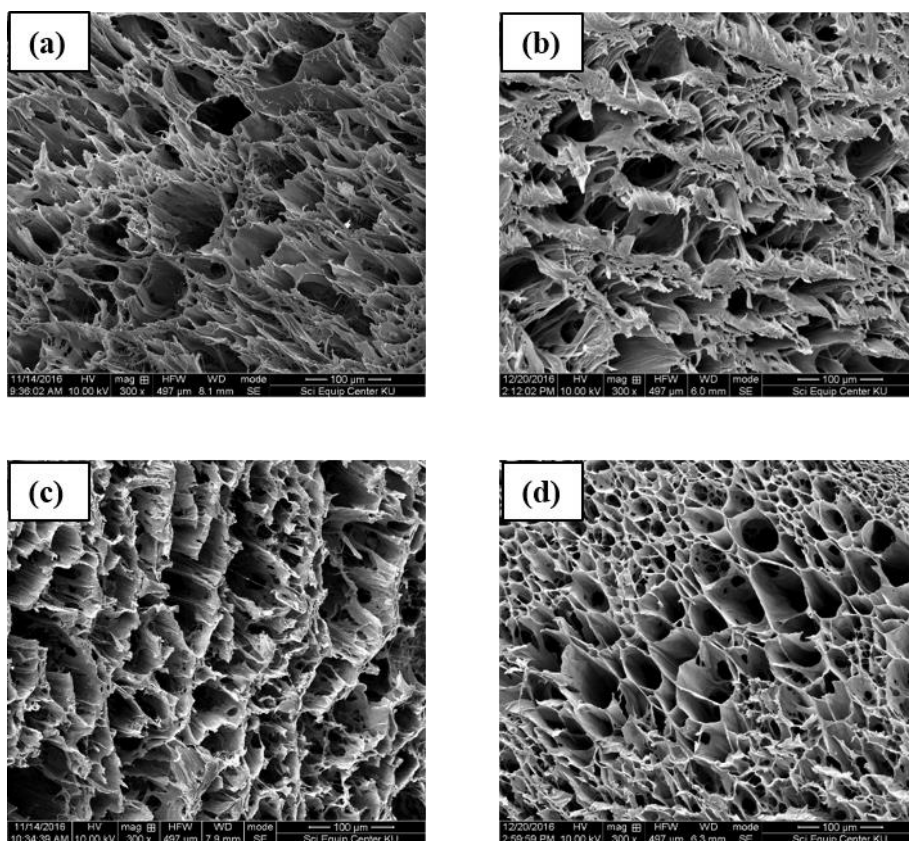
## 2. การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติโครงสร้างเลียงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ร่วมกับนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ด้วยวิธีการแช่ (Immersion)

### 2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาความเป็นรูพรุนของโครงสร้างเลียงเซลล์ที่เตรียมได้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างเลียงเซลล์ที่เตรียมจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ร่วมกับนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1 และ 3) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM) แสดงดังภาพที่ 34(a-d) โดยคุณสมบัติสำคัญของโครงสร้างเลียงเซลล์ คือ จำเป็นต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและจะต้องมีพื้นที่ว่างเพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตกลายเป็นเนื้อเยื่อได้ จากผลการทดลอง พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของตัวอย่างโครงสร้างเลียงเซลล์ที่เตรียมจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และนาโนเซลลูโลส (ไม่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์) (ภาพที่ 34a) และผสมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (ภาพที่ 34b-d) โดยทุกตัวอย่าง แสดงโครงสร้างที่มีรูพรุนสูง ในขณะที่โครงสร้างเลียงเซลล์ที่เตรียมจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ นาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์แสดงการเข้ากันได้ดีหรือเป็นเนื้อเดียวกัน และไม่แสดงการรวมตัวกันเองของทั้งเส้นใยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ในตัวอย่าง

จากตารางที่ 9 แสดงความเป็นรูพรุนและค่าอัตราการพองตัวของตัวอย่างโครงสร้างเลียงเซลล์ พบว่า เมื่อเพิ่มเติมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ในโครงสร้างเลียงเซลล์ ส่งผลให้ค่าความเป็นรูพรุนของโครงสร้างเลียง

เซลล์มีแนวโน้มลดลง จากร้อยละ 62 เหลือเพียงร้อยละ 58 เนื่องจากการที่อยู่ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ในโครงเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ ขนาดของรูพรุนในตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ทุกตัวอย่างมีค่าประมาณ 100 – 400 ไมโครเมตร ซึ่งความเป็นรูพรุนดังกล่าว เป็นคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ต้องมีขนาดใหญ่พอที่จะให้เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเจริญได้ (Lee *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011)



ภาพที่ 34 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ต่างๆ (กำหนดให้ a คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลล์ูโลส, b คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลล์ูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 0.5, c คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลล์ูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 1 และ d คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลล์ูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 3)

**ตารางที่ 9** ความเป็นรูพรุนและค่าอัตราการพองตัวของโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ นาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์

| Sample               | Porosity (%) | Equilibrium swelling ratio (%) |
|----------------------|--------------|--------------------------------|
| PC <sup>a</sup>      | 62.4 ± 4.3   | 535 ± 57.4                     |
| PCH0.5% <sup>b</sup> | 58.3 ± 1.4   | 415 ± 155.5                    |
| PCH1% <sup>c</sup>   | 56.6 ± 0.6   | 396 ± 103.5                    |
| PCH3% <sup>d</sup>   | 58.2 ± 1.2   | 528 ± 28.33                    |

**หมายเหตุ** กำหนดให้ a คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลส, b คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 0.5, c คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 1 และ d คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 3

## 2.2 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค FTIR

การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างทางเคมีของโครงเลี้ยงเซลล์สามารถวิเคราะห์ได้จากเทคนิค FT-IR ดังแสดงในภาพที่ 35 ซึ่งพอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ทั้งหมดแสดงช่วงการดูดกลืน 4000-500  $\text{cm}^{-1}$

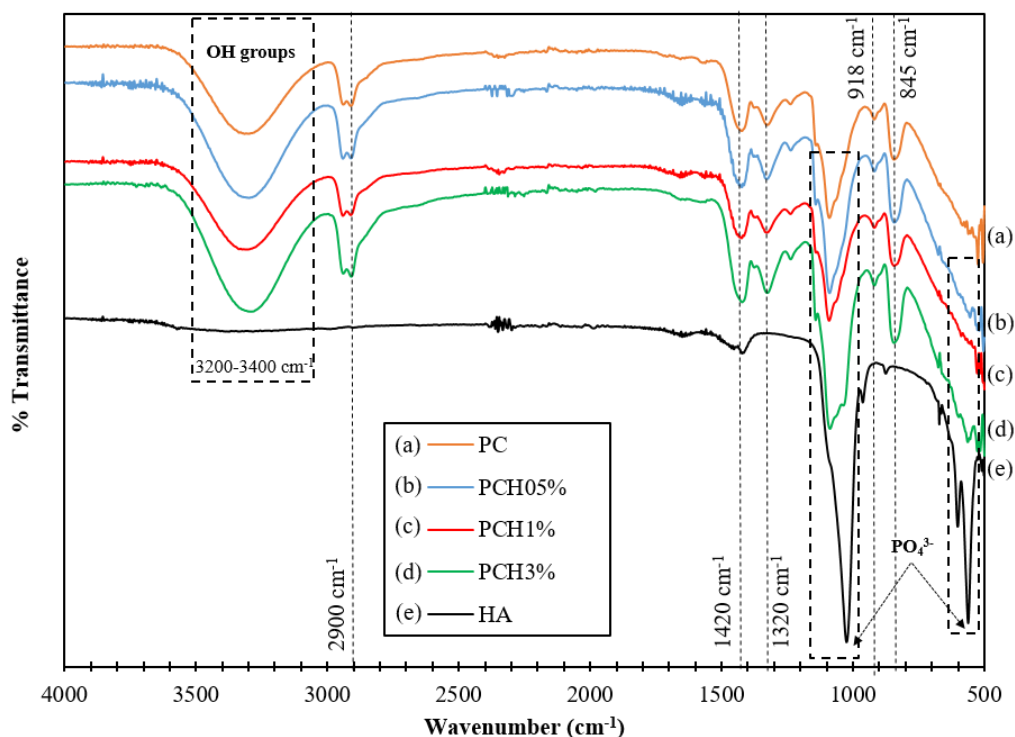
สเปกตรัมของโครงเลี้ยงเซลล์ของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลส (ภาพที่ 35a) พบพีกที่เลขคลื่น 2900  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเกิดจาก  $\text{CH}_2$  asymmetric stretching และพบพีกเลขคลื่นที่บริเวณ 1420  $\text{cm}^{-1}$  แสดงถึง  $\text{CH}_2$  scissoring motion ของโครงสร้างเซลลูโลส และพีกที่เลขคลื่น 1320  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเกิดจาก  $\text{CH}_2$  wagging นอกจากนี้พบพีกที่เลขคลื่น 918  $\text{cm}^{-1}$  แสดงถึง C-O stretching และพีกที่เลขคลื่น 845  $\text{cm}^{-1}$  เกิดจาก C-C stretching โดยพีกที่เลขคลื่น 1427  $\text{cm}^{-1}$  แสดงถึงความเป็นโครงสร้างของเซลลูโลส I (Kumar *et al.*, 2014b)

จากผลการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR พบว่า ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธะทางเคมีและโครงสร้างโมเลกุลของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และนาโนเซลลูโลส โดยส่งผลให้อินฟราเรดสเปกตรัมที่ปรากฏขึ้นแตกต่างกัน นอกจากนี้สามารถยืนยันได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ มีส่วนประกอบของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ จากภาพที่ 35b-35d แสดงช่วงการดูดกลืน 3500-3200

$\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเกิดจาก O-H stretching vibration ของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ในโมเลกุลของสารประกอบและแสดงถึงแนวโน้มการดูดซับน้ำของสารประกอบเนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลของโมเลกุลน้ำ (Liu *et al.* 2004; Sahai and Tossell 2000) นอกจากนั้นช่วงการดูดกลืนที่เลขคลื่น 2900 นาโนเมตร แสดงถึง  $-\text{CH}_2$  asymmetric stretching ของหมู่อะลิฟาติก และพีคที่เลขคลื่น 1092, 1035–1031, 603 และ  $565 \text{ cm}^{-1}$  สอดคล้องกับการสั่นสะเทือนที่แตกต่างกันของหมู่ฟอสเฟต ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ในอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ และพบพีคสำคัญของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ (ภาพที่ 35e) ในสารประกอบโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่ามีส่วนประกอบของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ ในโครงเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีส่วนประกอบของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์

เมื่อปริมาณของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ในสารประกอบโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ช่วงการดูดกลืนของหมู่ฟอสเฟต ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) เพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นความเข้มของช่วงการดูดกลืนที่เลขคลื่น 1500–1000  $\text{cm}^{-1}$  ของสเปกตรัมของสารประกอบโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ในสารประกอบโครงเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้น จากความเข้มข้นของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ร้อยละ 0.5 ถึง 3 และความเข้มของช่วงการดูดกลืนที่เลขคลื่น 3400–3200  $\text{cm}^{-1}$  เพิ่มขึ้นเนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลของนาโนเซลลูโลส

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี อาจเป็นผลมาจากหมู่ไฮดรอกซิลและแคลเซียมไอออนของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ และหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และนาโนเซลลูโลส แต่อย่างไรก็ตาม การซ้อนทับกันของช่วงการดูดกลืนอาจเป็นผลมาจากความเหมือนกันของหมู่ฟังก์ชันและแกนหลัก (backbone) ซึ่งโครงเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนหรือการจับตัวกันของ  $[\text{HO-}]-\text{Ca}^{2+}-[\text{-OH}]$  ส่งผลให้ประสิทธิภาพเชิงกลของสารประกอบโครงเลี้ยงเซลล์สูงขึ้น

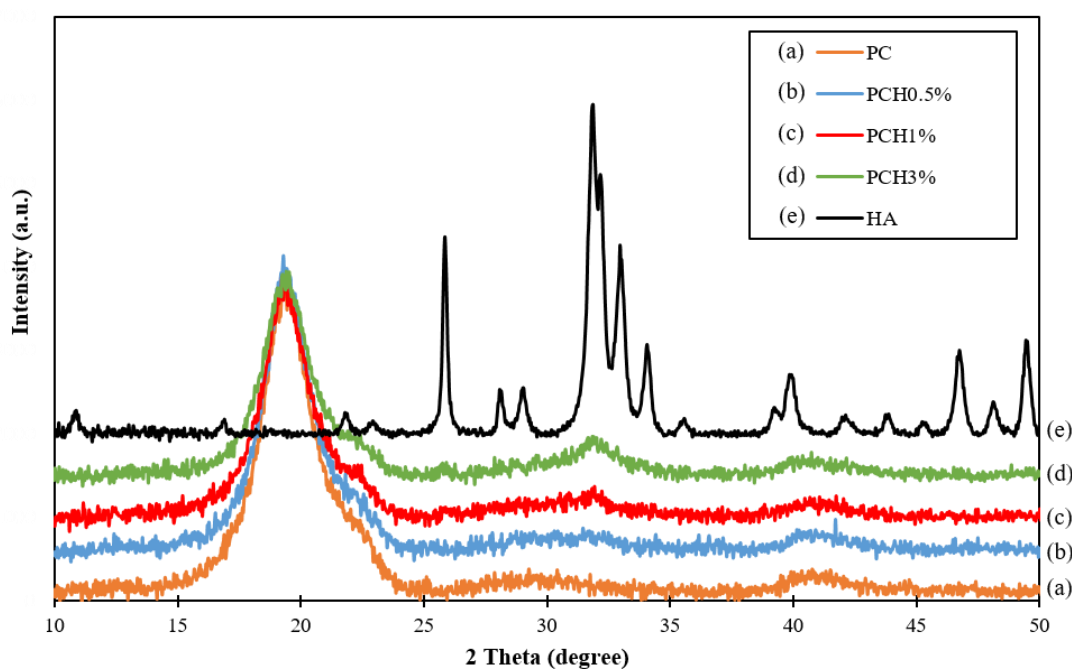


ภาพที่ 35 แสดงเส้นสเปกตรัมของโครงเลี้ยงเซลล์ (กำหนดให้ (a) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลส, (b) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ร้อยละ 0.5, (c) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ร้อยละ 1, (d) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ร้อยละ 3 และ (e) คือ อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต)

### 2.3 การศึกษาโครงสร้างผลึกของโครงเลี้ยงเซลล์

ลักษณะรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต, พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลส และโครงเลี้ยงเซลล์แสดงดังภาพที่ 36 จากผลการทดลองพบว่า ลักษณะรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตแสดงพีคสำคัญ  $2\theta$  (ลักษณะผลึก) เท่ากับ 25.9 (0 0 2), 31.9 (2 1 0), 32.9, 33.2 (2 1 1), 34.2, 35.1, 40.1 (3 1 0), 46.7 (2 2 2), 48.1 (3 1 2) และ 49.5 (2 1 3) องศา ในขณะที่ลักษณะรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์แสดงพีคสำคัญ  $2\theta$  เท่ากับ 19.4 และ 40.30 องศา ซึ่งเป็นลักษณะของรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ จากนั้น เมื่อผสมเส้นใยนาโนเซลลูโลสกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ พบว่า แสดงพีคสำคัญของเซลลูโลสที่  $2\theta$  เท่ากับ 22.5 (2 0 0) และ 34.5 (0 0 4) องศา ซึ่งแสดงลักษณะรูปแบบผลึกของเซลลูโลส I (Cellulose I) (Chen *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013) ในขณะที่ยังแสดงพีคสำคัญที่แสดงถึงลักษณะผลึกของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์  $2\theta$  เท่ากับ 19.4, 20.1 (1 0 1), 22.5 (2 0 0) และ 40.3 องศา (Kumar *et al.*,

2014b) ในขณะเดียวกัน เมื่อศึกษาลักษณะรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ในโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า ตัวอย่างแสดงพีค 2 $\theta$  เท่ากับ 31.8 องศา ซึ่งแสดงถึงลักษณะผลึก (2 1 1), (1 1 2), (2 0 2) และ (3 0 0) ที่เป็นของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ (Zhang *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2013)

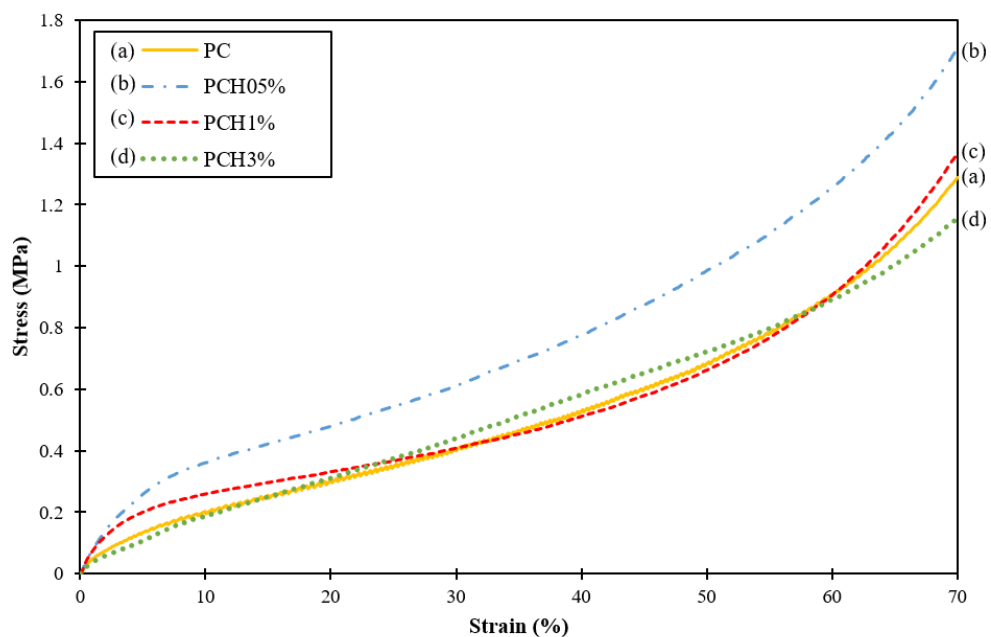


ภาพที่ 36 ลักษณะรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ต่าง ๆ (กำหนดให้ (a) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลส, (b) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ร้อยละ 0.5, (c) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ร้อยละ 1, (d) คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์กับนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ร้อยละ 3 และ (e) คือ อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์)

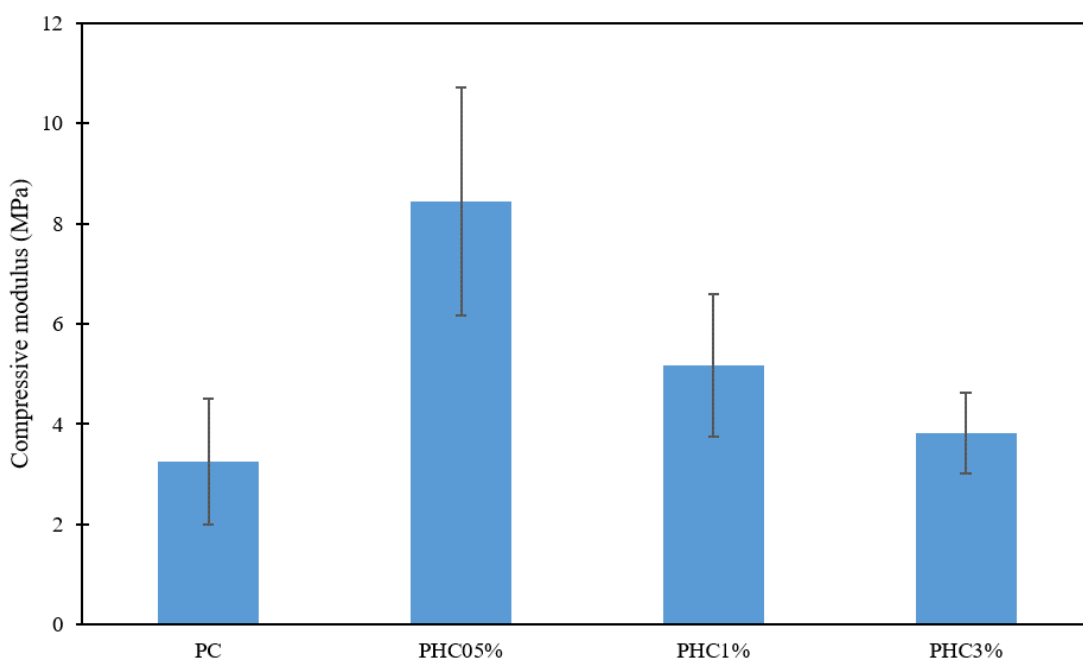
## 2.4 การศึกษาคุณสมบัติทางกล (Mechanical property)

คุณสมบัติเชิงกล เป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่ง โดยใช้เป็นปัจจัยในการพิจารณาวัสดุที่ใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ จากภาพที่ 37 แสดงกราฟความสัมพันธ์แรงกด (Compressive) ระหว่างความเค้นกับความเครียด (Stress-strain) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ จากผลการทดลอง พบว่า กราฟดังกล่าวแสดงรูปแบบของ elasto-plastic foam โดยค่าเฉลี่ยของความเค้นโมดูลัส (Compression modulus) แสดงดังภาพที่ 37 (ค่า

เปรียบเทียบมาตรฐานของตัวอย่างแตกต่างกันตามจุดในตัวอย่างที่ตรวจวัด) จากภาพที่ 38 พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของ Linear elastic และ Plastic regimes โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณของอนุภาคไฮดรอกซีแอปาไทต์ที่เพิ่มขึ้นในตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ ส่งผลให้ค่าความแข็งแรงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของปริมาณไฮดรอกซีแอปาไทต์ในตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ ส่งผลให้ค่า compression modulus มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ (Control PC) มีค่า compression modulus เท่ากับ 3.26 MPa ในขณะที่เมื่อผสมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก (PHC 0.5%) มีค่า compression modulus เท่ากับ 8.44 MPa โดยค่า compression modulus เพิ่มขึ้นมากถึงร้อยละ 259 อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์เป็นร้อยละ 1 และ 3 โดยน้ำหนัก พบว่า ค่า compression modulus มีค่าลดลง เท่ากับ 5.17 และ 3.82 MPa ตามลำดับ โดยผลของอนุภาคไฮดรอกซี-แอปาไทต์ต่อคุณสมบัติเชิงกลของโครงเลี้ยงเซลล์ (ที่เตรียมจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และนาโนเซลลูโลส) เกิดจากอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ที่อยู่ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีผลต่อสมบัติทางกล (Avella *et al.*, 2012) ซึ่งส่งผลให้ค่าความแข็งแรง (Strength) และความแข็ง (Stiffness) ของโครงเลี้ยงเซลล์ สอดคล้องกับรายงานของ Avella และคณะ (2012) และ Kumar และคณะ (2014) รายงานว่า ค่าสมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นตามปริมาณของแข็ง (Solid contents) ในขณะที่ปัจจัยส่งผลให้ค่าสมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลงนั้น (ในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผสมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ร้อยละ 1 และ 3 โดยน้ำหนัก) เกิดจากการที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์มีปริมาณมีมากเกินไป ส่งผลโดยตรงต่อโครงสร้างผลึก (Crystalline structure) และการจัดเรียงตัวโมเลกุลของโฮสพอลิเมอร์ (Host polymer)



ภาพที่ 37 กราฟแสดงค่า Compressive stress-strain ของ PC (a), PCH0.5% (b), PCH1% (c), PCH3% (d)



ภาพที่ 38 แสดงค่า Compressive modulus ของโครงเลี้ยงเซลล์ ที่ผสมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ร้อยละ 0.5-3 โดยน้ำหนัก

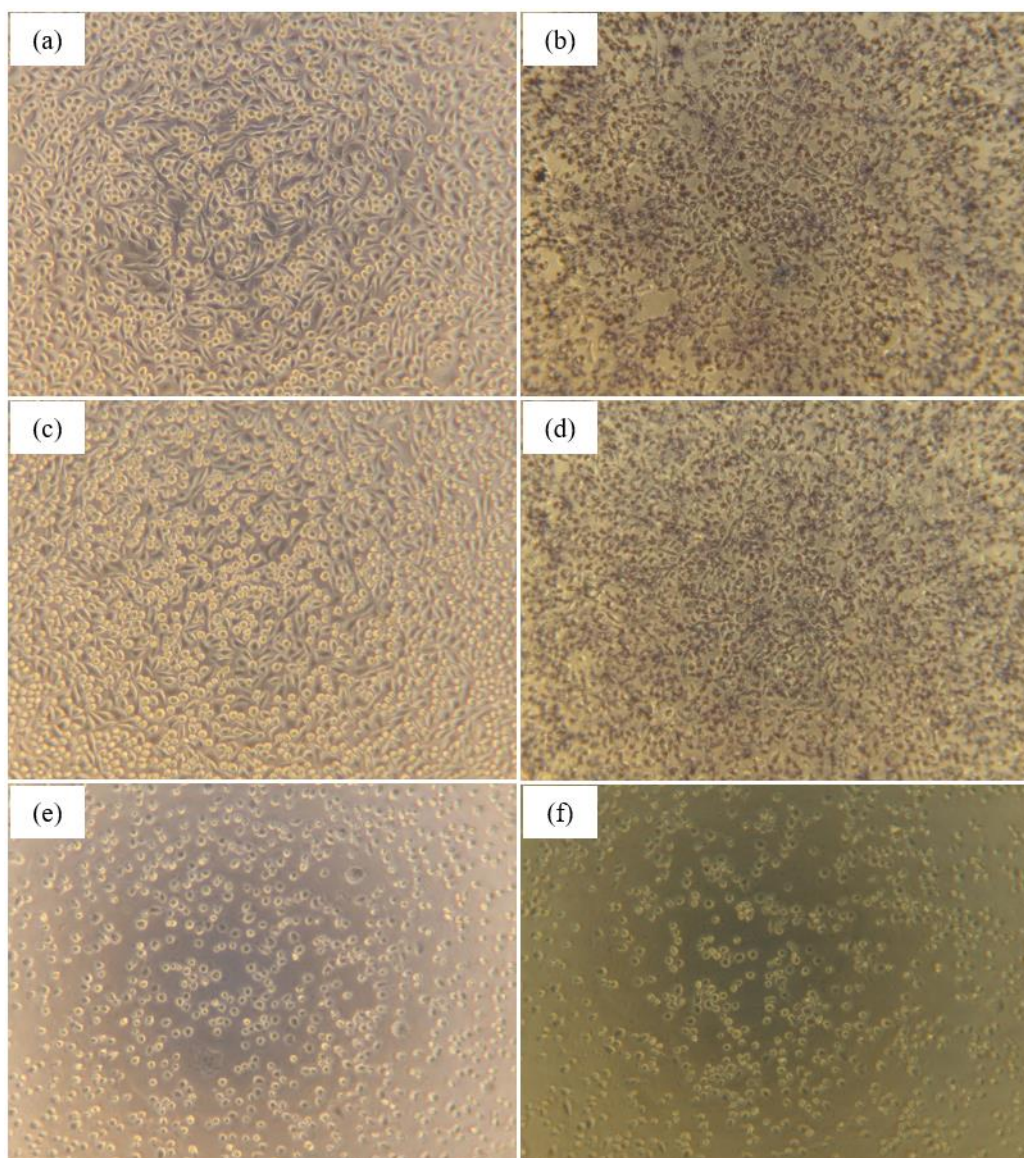
## 2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นขั้นตอนที่สำคัญของการประเมินโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ โดยการทดสอบขั้นตอนแรกจะเป็นส่วนของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และทดสอบในห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) ตามวิธีมาตรฐาน ISO 10993-5:2009 (E) Annex C (Costa *et al.*, 2007; Lin and Dufresne, 2014) โดยวิธี MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay โดยทดสอบกับเซลล์ L929 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาและดูความเปลี่ยนแปลงของเซลล์ L929 ที่ทดสอบ แสดงดังภาพที่ 39 ในการทดลองนี้ ใช้โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก โดยเปรียบเทียบกับชุดการทดลองแบบบวก (Positive control) คือ เป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic), ชุดการทดลองแบบลบ (Negative control) คือ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (non-cytotoxic)

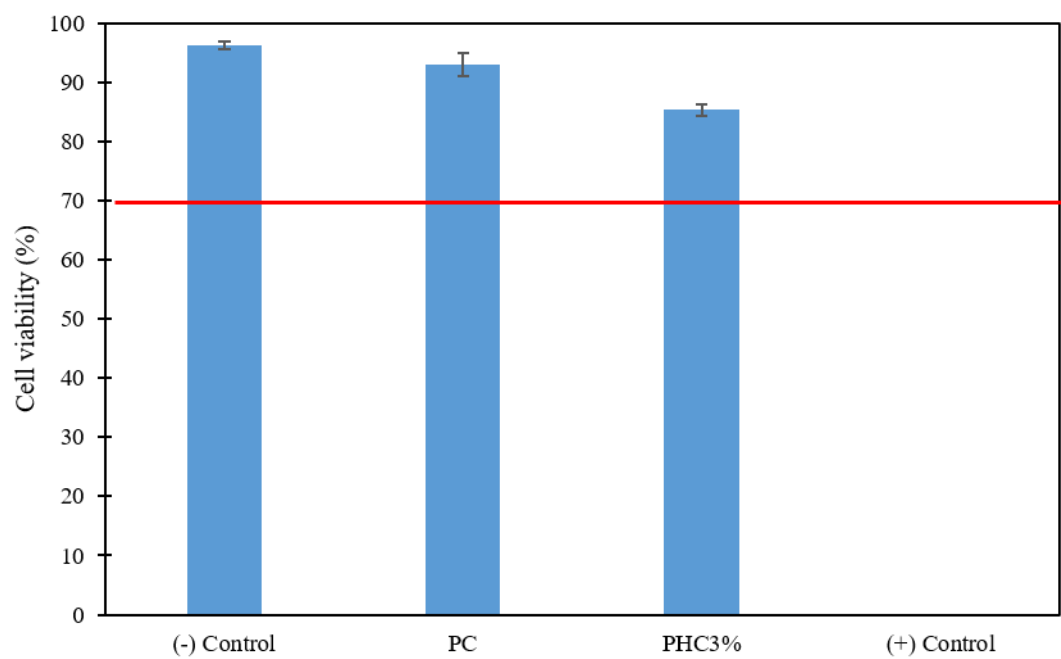
จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ L929 ในชุดการทดลองแบบลบและชุดการทดลองโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก พบว่า ไม่มีความแตกต่างด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ L929 อย่างมีนัยสำคัญ (ค่าระดับความเชื่อมั่น มากกว่า 0.05) เซลล์ L929 ที่ถูกทดสอบทั้งในชุดการทดลองแบบลบ โดยตัวอย่างที่ทดสอบจะต้องมีค่าเซลล์ที่มีชีวิตมี

ค่า Viability threshold (ตัวอย่างสัมผัสกับเซลล์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่ทำให้เซลล์ตายหรือเสียสภาพ) มากกว่าร้อยละ 70 จะถือว่าตัวอย่างวัสดุนั้น ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

จากภาพที่ 40 แสดงค่าเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability) ของทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ไม่มีและมีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก (โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์และนาโนเซลลูโลสสูงสุด) โดยเปรียบเทียบค่าดังกล่าวกับชุดการทดลองแบบบวกและลบ โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์มีค่าเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับร้อยละ  $92 \pm 2.02$  ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lam และคณะ (2017) ที่รายงานว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และนาโนเซลลูโลสไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ชุดการทดลองแบบบวกมีค่าเซลล์รอดชีวิตร้อยละ 0 (แสดงภาพที่ 39) จากผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ นาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์แสดงว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ L929 ซึ่งเป็นผลการทดลองสำคัญที่สามารถยืนยันได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ สามารถประยุกต์ใช้ได้จริง



**ภาพที่ 39** ลักษณะของเซลล์ทดสอบ L929 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ภายหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (a) ชุดการทดลองควบคุมแบบลบ, (c) โครงเลี้ยงเซลล์ไม่มีและมีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทาไรต์ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก, (e) ชุดการทดลองควบคุมแบบบวก ในขณะที่ (b) ชุดการทดลองควบคุมแบบลบ, (d) โครงเลี้ยงเซลล์ไม่มีและมีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทาไรต์ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก, (f) ชุดการทดลองควบคุมแบบบวก หลังจากการวิเคราะห์ด้วย MTT assay



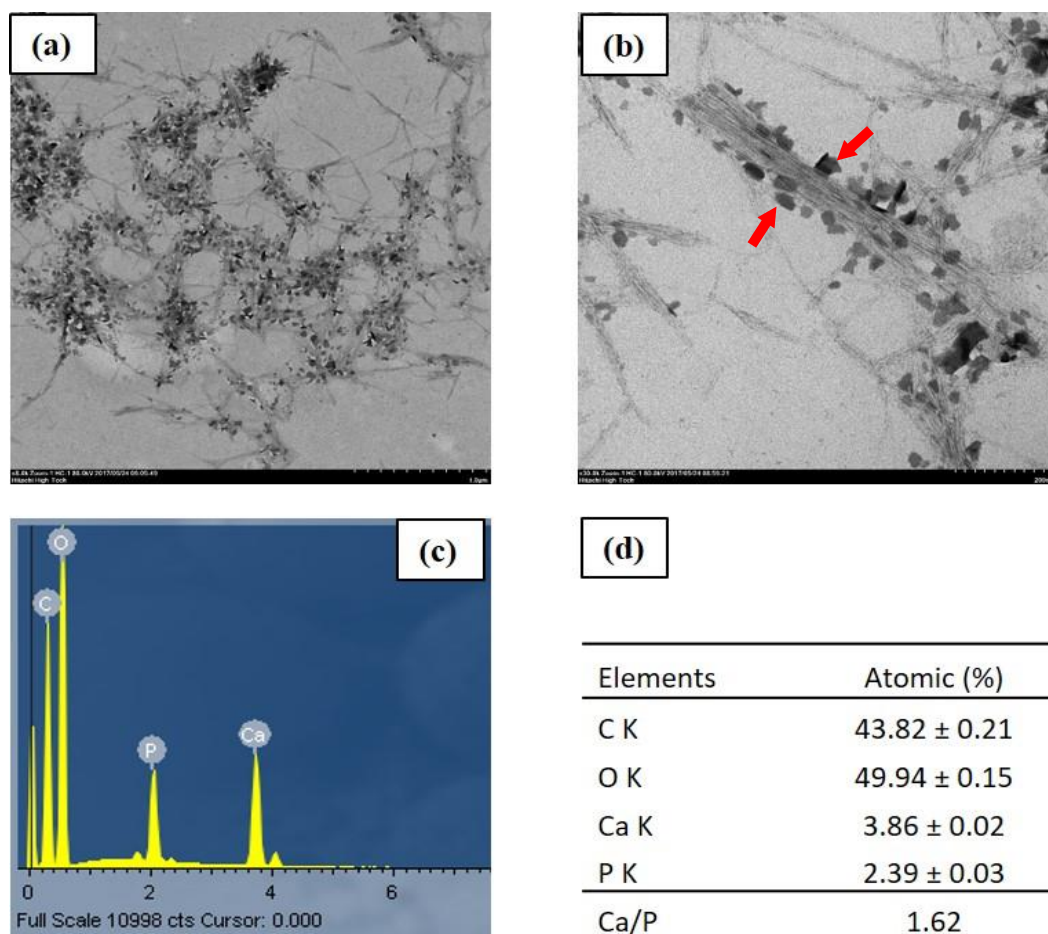
ภาพที่ 40 ค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีและมือนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 0.5-3 โดยน้ำหนัก (เส้นสีแดง คือ ค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตร้อยละ 70)

### 3. การศึกษากระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์โดยตรง (*In situ synthesis*) ในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส และการขึ้นรูปและคุณสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์

#### 3.1 ผลการศึกษากระบวนการการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์โดยตรง (*In situ synthesis*) ในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส และการศึกษาคุณสมบัติ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, TEM) และองค์ประกอบและปริมาณของธาตุในตัวอย่างด้วยเทคนิค Energy dispersive spectroscopy (EDS) เพื่อศึกษาผลของการกระจายตัวของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์บนพื้นผิวของเส้นใยของนาโนเซลลูโลส เพื่อใช้เป็นหลักฐานยืนยัน โดยศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร่วมกับสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่กำลังขยาย 10,000 และ 30,000 เท่า แสดงดังภาพที่ 41a และ 40b ตามลำดับ จากผลการทดลอง พบว่า ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะของเส้นใยนาโนเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นท่อนสั้น โดยมีขนาดความยาวประมาณ 200-350 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 – 15 นาโนเมตร และภาพถ่ายดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่สังเคราะห์ขึ้น มีลักษณะคล้ายทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30-40 นาโนเมตร เกาะติดอยู่กับบริเวณผิวของเส้นใยนาโนเซลลูโลส และกระจายตัวอยู่ทั่วในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส ซึ่งสามารถยืนยันได้จากภาพถ่ายที่กำลังขยายในมุมมองกว้าง (10,000 เท่า) ในภาพที่ 41a

จากภาพที่ 41c-d แสดงผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของธาตุในตัวอย่างด้วยเทคนิค EDS ในตัวอย่างสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ซึ่งแสดงเป็นกราฟที่แสดงปริมาณองค์ประกอบของธาตุชนิดต่าง ๆ (ภาพที่ 41c) และสัดส่วนของปริมาณธาตุในตัวอย่าง (ภาพที่ 41d) จากผลการทดลอง พบว่า มีธาตุคาร์บอน ออกซิเจน แคลเซียม และฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ โดยธาตุคาร์บอนและออกซิเจน จะพบในโครงสร้างของนาโนเซลลูโลสซึ่งมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบต่อกันเป็นสายยาว ในขณะที่ธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่พบในตัวอย่างนั้น แสดงถึงการมีอยู่ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ซึ่งมีสัดส่วนของปริมาณธาตุแคลเซียมต่อธาตุฟอสฟอรัส เท่ากับ ร้อยละ 1.6 ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าอนุภาคที่เกาะอยู่บริเวณผิวของเส้นใยนาโนเซลลูโลส (จากภาพที่ 41a และ 40b) เป็นอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์จริง จากผลการทดลองในภาพที่ 41 ซึ่งเป็นหลักฐานยืนยันให้เห็นได้ชัดเจนว่ากระบวนการสังเคราะห์และขึ้นรูปด้วยการสังเคราะห์แบบโดยตรง (*In situ synthesis*) ด้วยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส ก่อนจะผสมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ สามารถเตรียมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่กระจายตัวได้ดีในเส้นใยนาโนเซลลูโลส ก่อนการผสมในสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

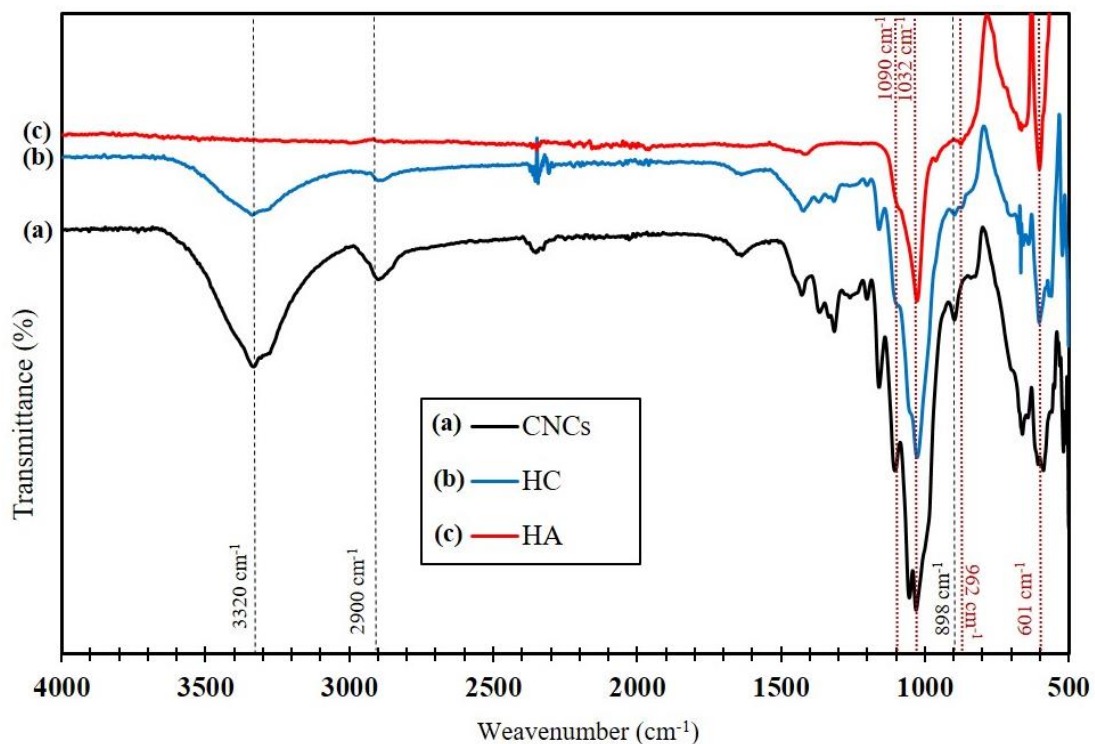


**ภาพที่ 41** ลักษณะของเส้นใยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์เกาะอยู่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า (a) และ 30,000 เท่า (b) กราฟแสดงปริมาณองค์ประกอบของธาตุต่างๆในตัวอย่างสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ (c) และสัดส่วนของปริมาณธาตุในตัวอย่าง (d)

จากนั้น ศึกษาคุณสมบัติทางด้านองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีของสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ด้วยเทคนิค FTIR เพื่อใช้สนับสนุนและยืนยันผลการวิจัยของภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ภาพที่ 42) โดยผลการศึกษาดังกล่าวด้วยเทคนิค FTIR แสดงดังภาพที่ 41 พบว่า เส้นสเปกตรัมของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ (เส้นสีแดง, สัญลักษณ์ (c)) ลักษณะสเปกตรัมแสดงพีคสำคัญของแคลเซียมฟอสเฟต (Calcium phosphate,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารประกอบจำพวกไฮดรอกซีแอปพาไทต์ โดยเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ (HA) (เส้นแดง, สัญลักษณ์ (c)) และสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ (HC) (เส้นสีน้ำเงิน, สัญลักษณ์ (b)) แสดงพีคสำคัญที่เลขคลื่น เท่ากับ 962 1091 และ 1032  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นพีคเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปพาไทต์ และนอกจากนี้ ยังแสดงพีคสำคัญที่เกี่ยวกับองค์ประกอบของหมู่

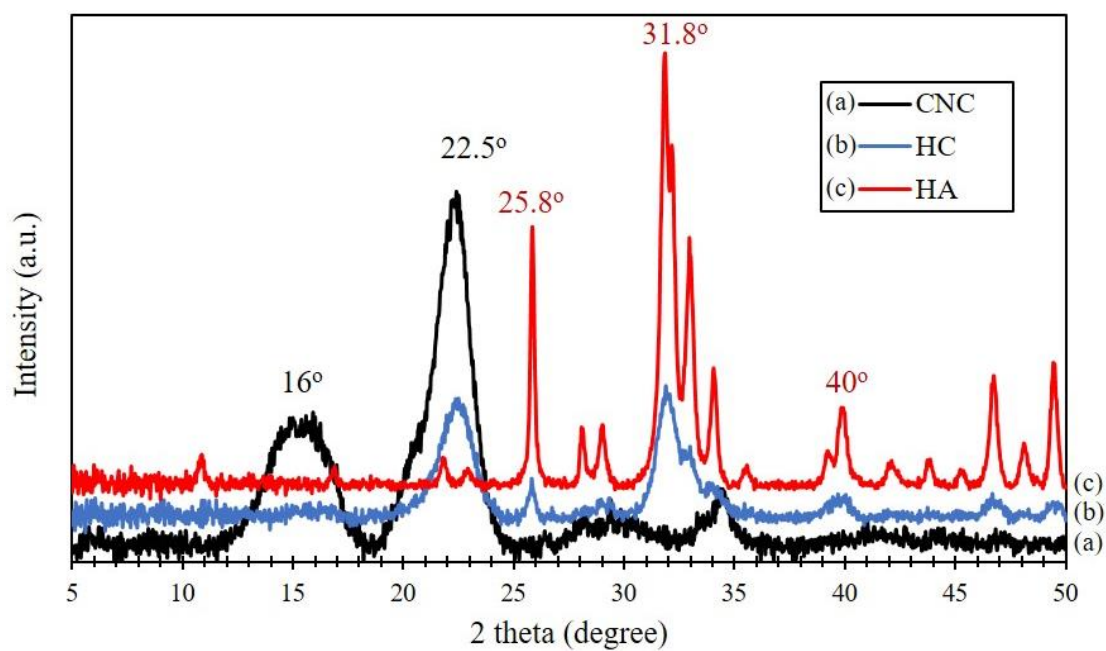
ฟอสเฟตในโครงสร้างของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ที่เลขคลื่นเท่ากับ  $604$  และ  $561\text{ cm}^{-1}$  ในขณะที่เส้นสเปกตรัมของตัวอย่างนาโนเซลลูโลส (เส้นสีดำ, สัญลักษณ์ (a)) และสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต (เส้นสีน้ำเงิน, สัญลักษณ์ (b)) แสดงพิกสำคัญที่แสดงถึงโครงสร้างของเซลลูโลส โดยปรากฏพิกสำคัญในช่วงเลขคลื่น  $3320$  และ  $2900\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงถึงหมู่ไฮดรอกซิล และพันธะ C-H ที่ปรากฏอยู่ในโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส และเส้นสเปกตรัมยังแสดงพิกที่เลขคลื่น  $898\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นแสดงถึงพันธะเบต้าไกลโคซิดิก (Glycosidic linkage) ระหว่างโมเลกุลของกลูโคสต่อกันเป็นสายเซลลูโลสนั่นเอง

ในขณะเดียวกัน เส้นสเปกตรัมของตัวอย่างสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ยังปรากฏพิกสำคัญที่แสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต โดยแสดงพิกที่เลขคลื่น  $962$   $1091$   $1032$  และ  $604\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นพิกเอกลักษณ์ของโครงสร้างหมู่ฟอสเฟตที่อยู่ในโมเลกุลของอนุภาคไฮดรอกซีแอปาทิต ซึ่งสอดคล้องกับเส้นสเปกตรัมของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตบริสุทธิ์ (เส้นสีแดง, สัญลักษณ์ (c)) นอกจากนี้ พิกที่เลขคลื่น  $1091$  และ  $1032\text{ cm}^{-1}$  ยังแสดงถึงพันธะระหว่าง P-O asymmetric stretching ของหมู่ฟอสเฟตด้วยเช่นกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบพิกสำคัญที่ปรากฏในเส้นสเปกตรัมของสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต กับเส้นสเปกตรัมของนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตบริสุทธิ์ พบว่า เส้นสเปกตรัมของสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตปรากฏพิกสำคัญหรือพิกเอกลักษณ์ทั้งนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต นอกจากนี้ พิกที่เลขคลื่นในช่วง  $3500 - 3400\text{ cm}^{-1}$  ที่แสดงถึงหมู่ไฮดรอกซิลของเซลลูโลส มีความเข้มของสัญญาณ (Peak intensity) เนื่องจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิลของเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตนั่นเอง โดยจากผลการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตแบบโดยตรง (*In situ* synthesis) ในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส ด้วยเทคนิค FTIR สามารถยืนยันผลการทดลองของภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 42 เส้นสเปกตรัมของตัวอย่างสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส (CNCs) อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต (HA) และสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต (HC)

จากภาพที่ 43 แสดงกราฟรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างนาโนเซลลูโลส อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต และสารแขวนลอยผสมของนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต โดยรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างนาโนเซลลูโลส แสดงพิกัดสำคัญ คือ 2 $\theta$  เท่ากับ 16 และ 22.5 องศา ซึ่งเป็นลักษณะเอกลักษณ์ของรูปแบบเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของเซลลูโลส I (Characteristic cellulose I) ในขณะที่ลักษณะการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต พบว่า ตัวอย่างแสดงพิกัด 2 $\theta$  เท่ากับ 31.8 องศา ซึ่งแสดงถึงลักษณะผลึก (Lattice) คือ (2 1 1), (1 1 2), (2 0 2) และ (3 0 0) ที่เป็นของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต (Cengiz *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2013) นอกจากนี้ เมื่อศึกษาตัวอย่างนาโนเซลลูโลสที่ผ่านกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต โดยตรง (*In situ* synthesis) พบว่า ลักษณะการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างดังกล่าว ยังแสดงพิกัดสำคัญ 2 $\theta$  เท่ากับ 16 และ 22.5 องศา ซึ่งแสดงถึงพิกัดเอกลักษณ์ของเซลลูโลส และเส้นรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างดังกล่าวยังคงแสดงพิกัดสำคัญ 2 $\theta$  เท่ากับ 25.8 31.8 และ 40 องศา ซึ่งแสดงถึงพิกัดเอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต จากผลการทดลองดังกล่าว สามารถยืนยันได้ว่า กระบวนการเตรียมโครงสร้างเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ร่วมกับนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ด้วยวิธีการ *In situ* synthesis (สังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสก่อนจะผสมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์) เป็นวิธีที่สามารถเตรียมอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตได้จริง

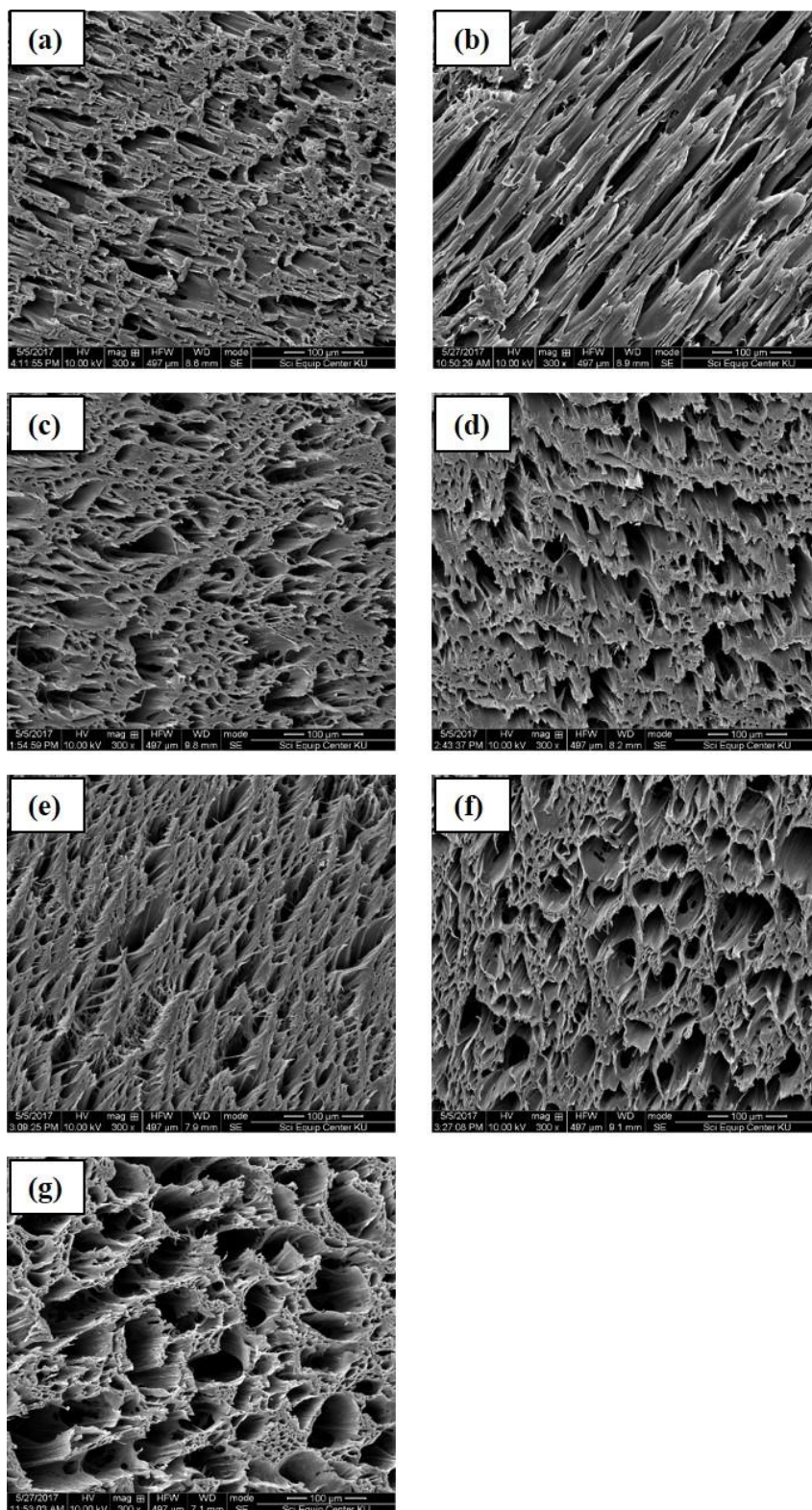


ภาพที่ 43 ลักษณะการเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส (CNCs) อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (HA) และสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (HC)

### 3.2 ผลการศึกษาการเตรียมและขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ร่วมกับสารแขวนลอยแขวนที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์

ในการใช้งานโครงเลี้ยงเซลล์จำเป็นต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะเดียวกัน ก็จำเป็นต้องการพื้นผิวเพื่อใช้เซลล์สามารถเกาะและเจริญเติบโตได้ ดังนั้น ลักษณะทางสัณฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ ถือเป็นปัจจัยสำคัญของโครงเลี้ยงเซลล์ต่อการตอบสนองต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณภาพดีจะต้องมีพื้นที่ผิวที่มากพอ ควรมีรูพรุนมากพอที่จะให้เซลล์สามารถเติบโตและเกาะภายในโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ได้ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ ศึกษาศึกษาความเป็นรูพรุน (Porosity) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ เพื่อใช้ประเมินคุณภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้จากกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์โดยตรง (*In situ synthesis*) ในสารแขวนลอยนาโนเซลล์ูโลส ก่อนที่จะผสมในสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และขึ้นรูปด้วยการแช่แข็งแบบเยือกแข็ง (กำหนดให้สัญลักษณ์ PHC แทนโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ นาโนเซลล์ูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์) ถูกศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงภาพตัดขวางของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารแขวนลอยนาโนเซลล์ูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ร้อยละ 0 – 12 โดยน้ำหนัก ดังภาพที่ 44

จากผลการทดลอง พบว่า ภาพถ่ายภาพได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของทุกตัวอย่าง แสดงโครงสร้างมีลักษณะเป็นรูพรุน และแสดงความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneous) โดยไม่แสดงการกระจุกตัวหรือการจับตัวเป็นกลุ่มของนาโนเซลล์ูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์หลังจากการผสมและขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ โดยลักษณะความเป็นเนื้อเดียวกันนี้สามารถยืนยันได้ว่า กระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์โดยตรง (*In situ synthesis*) ในสารแขวนลอยนาโนเซลล์ูโลส และผสมในสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ ค่าความเป็นรูพรุนของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลล์ูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ปริมาณต่างๆ แสดงดังตารางที่ 10 โดยเมื่อเพิ่มปริมาณของสารแขวนลอยนาโนเซลล์ูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ พบว่า ลักษณะความเป็นรูพรุนและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนในโครงเลี้ยงเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้น โดยเมื่อผสมสารแขวนลอยนาโนเซลล์ูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์มากถึงร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก พบว่า มีค่าความรูพรุนสูงสุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนประมาณ 100 – 400 ไมโครเมตร และมีการกระจายตัวของรูพรุนอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งหากพิจารณาผลของค่าความเป็นรูพรุนของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีสารแขวนลอยนาโนเซลล์ูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์มากถึงร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก พบว่า มีความเหมาะสมในการใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องศึกษาคุณสมบัติอื่นเพิ่มเติมด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะความพิษและความเข้ากันได้กับเซลล์ (Lee *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011)



ภาพที่ 44 ลักษณะภาพตัดขวางภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ ที่มีนาโนเซลลูโลสและไฮดรอกซีแอปาทาइटปริมาณต่าง ๆ กำหนดให้ PVA (a), PHC-2 (b), PHC-4 (c), PHC-6 (d), PHC-8 (e), PHC-10 (f) and PHC-12 (g)

ตารางที่ 10 ค่าความเป็นรูพรุนและอัตราการพองตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและไฮดรอกซีแอ-  
ปาไทต์ปริมาณต่างๆ

| Sample | Porosity (%) | Equilibrium swelling ratio (%) |
|--------|--------------|--------------------------------|
| PVA    | 55.95 ± 1.93 | 626.95 ± 21.84                 |
| PHC-2  | 56.09 ± 3.32 | 784.50 ± 69.77                 |
| PHC-4  | 56.05 ± 1.20 | 739.25 ± 47.95                 |
| PHC-6  | 57.07 ± 2.10 | 1011.01 ± 85.30                |
| PHC-8  | 54.23 ± 1.04 | 586.67 ± 38.90                 |
| PHC-10 | 56.16 ± 1.16 | 771.83 ± 34.95                 |
| PHC-12 | 58.29 ± 1.76 | 865.38 ± 33.46                 |

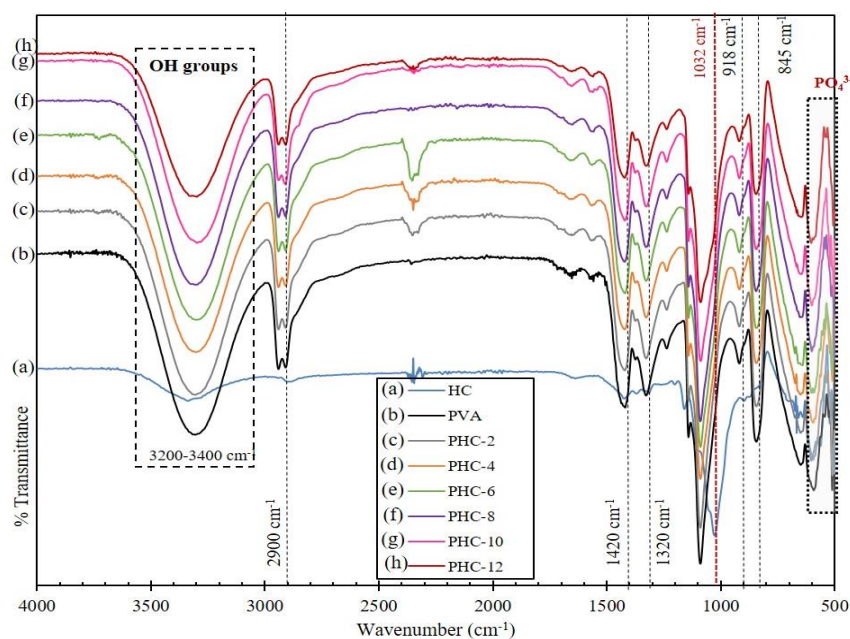
หมายเหตุ กำหนดให้สัญลักษณ์ PHC แทนโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอ-  
ปาไทต์ปริมาณต่าง ๆ

### 3.2.2 ศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FTIR

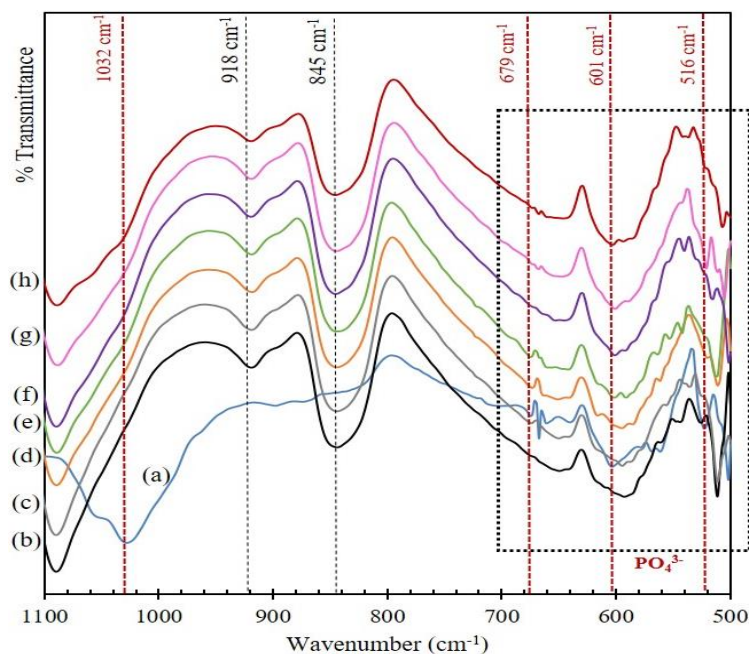
จากนั้น ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มี  
อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ร้อยละ 0 – 12 โดยน้ำหนัก (กำหนดสัญลักษณ์แทนด้วย PHC) ด้วยเทคนิค  
FTIR ในช่วงความยาวคลื่นที่ 4000 – 500  $\text{cm}^{-1}$  เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ในเชิงพันธะเคมีระหว่างพอลิไวนิลแ  
กอกออล นาโนเซลลูโลส และอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์หลังจากกระบวนการผสมและขึ้นรูปโครงเลี้ยง  
เซลล์ โดยแสดงดังภาพที่ 45 พบว่า เส้นสเปกตรัมของตัวอย่างทั้งหมด ได้แก่ โครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแ  
กอกออล (กำหนดสัญลักษณ์แทนด้วย PVA) และโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอกอกออลที่มีนาโนเซลลูโลสและ  
อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาไทต์ที่ปริมาณต่างๆ (กำหนดสัญลักษณ์แทนด้วย PHC 2-12) แสดงพิกสำคัญที่  
เลขคลื่น ได้แก่ พิกที่เลขคลื่น 2900  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงถึง  $\text{CH}_2$  asymmetric stretching พิกที่เลขคลื่น 1420  
 $\text{cm}^{-1}$  แทน  $\text{CH}_2$  scissoring motion ในโครงสร้างเซลลูโลส พิกที่เลขคลื่น 1320  $\text{cm}^{-1}$  แทนโครงสร้าง  $\text{CH}_2$   
wagging พิกที่เลขคลื่น 918  $\text{cm}^{-1}$  แทนพันธะ C–O stretching และพิกที่เลขคลื่น 845  $\text{cm}^{-1}$  แทนพันธะ C–  
C stretching นอกจากนี้ พิกที่เลขคลื่น 1450  $\text{cm}^{-1}$  ที่ปรากฏในเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างนั้น แสดงถึง  
โครงสร้างของเซลลูโลส I (Cellulose I) ซึ่งแสดงถึงเส้นใยนาโนเซลลูโลสที่อยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์นั่นเอง  
(Kumar *et al.*, 2014b)

ผลการทดลองดังกล่าวที่ศึกษาด้วยเทคนิค FTIR สามารถยืนยันได้ว่าในโครงเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอกอฮอล์มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตอยู่จริง โดยเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 45 เส้น c ถึง i) แสดงพิกใน ช่วงความยาวคลื่น  $3400 - 3200\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงพันธะระหว่างโมเลกุลของน้ำในโครงเลี้ยงเซลล์ (Liu *et al.* 2004; Sahai and Tossell 2000) นอกจากนี้ พิกที่เลขคลื่นในช่วง  $2900\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงโครงสร้างหมู่  $-\text{CH}_2$  aliphatic ในตัวอย่าง จากภาพที่ 46 แสดงพิกที่เลข 1032 679 601 และ  $516\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงหมู่ฟอสเฟตที่ vibration แตกต่างกัน โดยเมื่อพิจารณาพิกสำคัญจากเส้นสเปกตรัมของสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตเทียบกับเส้นสเปกตรัมของโครงเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอกอฮอล์มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต พบว่า มีพิกสำคัญที่ยืนยันการมีอยู่ของเส้นใยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตในโครงเลี้ยงเซลล์

จากการศึกษาเส้นสเปกตรัมดังกล่าว พบว่า เมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต (กำหนดสัญลักษณ์แทนด้วย HC) จะส่งผลต่อโครงสร้างและพันธะเคมีในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมขึ้น ส่งผลให้มีความแตกต่างกันของความเข้มสัญญาณ (Intensity) และตำแหน่งของคลื่นเลขของพิกที่สำคัญ โดยเมื่อความเข้มข้นของสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความเข้มสัญญาณของพิกที่ฟอสเฟสลดลง ในขณะที่พิกที่ความยาวคลื่นในช่วง  $3400 - 3200\text{ cm}^{-1}$  มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันเนื่องจากการลดลงของหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างเพื่อใช้ในการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างนาโนเซลลูโลส พอลิไวนิลแอกอฮอล์ และพันธะไฮโดรเจนระหว่างไฮดรอกซิลของนาโนเซลลูโลส พอลิไวนิลแอกอฮอล์และอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ( $[\text{HO}^-]-\text{Ca}^{2+}-[\text{OH}]$  linkages) (Fenglan *et al.* 2004)



ภาพที่ 45 ลักษณะเส้นสเปกตรัม FTIR ในช่วง 4000 – 500  $\text{cm}^{-1}$  ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและไฮดรอกซีแอพาไทต์ปริมาณต่าง ๆ กำหนดให้ HC (a), PVA (b), PHC-2 (c), PHC-4 (d), PHC-6 (e), PHC-8 (f), PHC-10 (g) and PHC-12 (h)



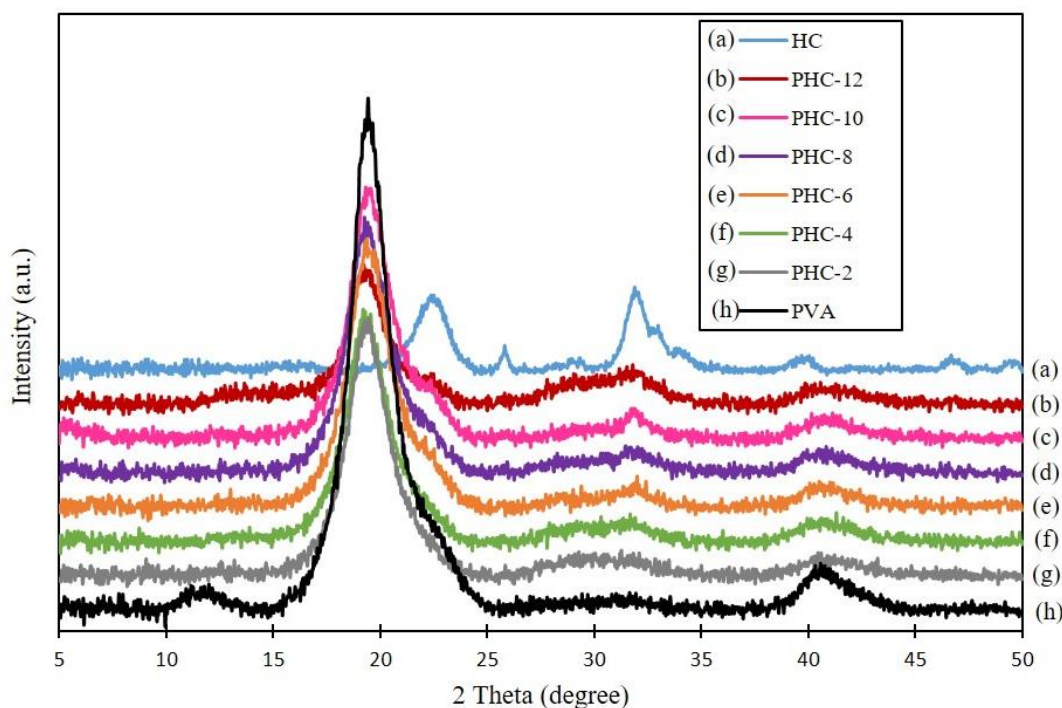
ภาพที่ 46 ลักษณะเส้นสเปกตรัม FTIR ในช่วง 1100 – 500  $\text{cm}^{-1}$  ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและไฮดรอกซีแอพาไทต์ปริมาณต่าง ๆ กำหนดให้ HC (a), PVA (b), PHC-2 (c), PHC-4 (d), PHC-6 (e), PHC-8 (f), PHC-10 (g) and PHC-12 (h)

### 3.2.3 ศึกษาโครงสร้างทางผลึกด้วยเทคนิค XRD

โครงสร้างทางผลึกของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ถูกศึกษาด้วยเทคนิครูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ แสดงดังภาพที่ 47 (กำหนดให้เส้น a แทนสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (HC) เส้น h แทนพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) และเส้น b–g แทนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (PHC))

จากผลการทดลอง พบว่า ลักษณะการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ แสดงพิกัดสำคัญ 2 $\theta$  (วงเล็บลักษณะ Lattice ของผลึก) เท่ากับ 25.9 องศา (0 0 2), 31.9 องศา (2 1 0), 32.9 องศา และ 33.2 องศา (2 1 1), 34.2 องศา, 35.1 องศา และ 40.1 องศา (3 1 0), 46.7 องศา (2 2 2), 48.1 องศา (3 1 2) และ 49.5 องศา (2 1 3) ในขณะที่ลักษณะการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ แสดงรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์เฉพาะของโครงสร้างพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ 2 $\theta$  เท่ากับ 19.4 และ 40.3 องศา และเมื่อพิจารณาถึงรูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ พบว่า แสดงพิกัดสำคัญที่แสดงถึงนาโนเซลลูโลสในโครงสร้าง ที่ 2 $\theta$  เท่ากับ 22.4 (2 0 0) และ 34.5 (0 0 4) โดยเป็นพิกัดเอกลักษณ์ของโครงสร้างเซลลูโลส (Chen *et al.* 2011; Liu *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2013) ในขณะที่ยังแสดงพิกัดสำคัญที่ 2 $\theta$  เท่ากับ 19.4, 20.1 (1 0 1), 22.5 (2 0 0) และ 40.3 องศา ที่เป็นลักษณะโครงสร้างแบบ Semi-crystalline ของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Kumar *et al.*, 2014b) ในส่วนของลักษณะการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ที่อยู่ในโครงเลี้ยงเซลล์ แสดงพิกัด 2 $\theta$  เท่ากับ 31.8 องศา ซึ่งมีลักษณะ Lattice plane ที่ (2 1 1), (1 1 2), (2 0 2) และ (3 0 0) (Zhang *et al.* 2010; Chang *et al.* 2013)

นอกจากนี้ เมื่อเพิ่มปริมาณของสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสที่มีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ พบว่า ค่าความเป็นผลึกของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ในขณะที่พิกัดของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ (19.5 องศา) มีความเข้มสัญญาณลดลงหลังจากผสมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ เนื่องจากการทำพันธะระหว่างนาโนเซลลูโลส อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ จากผลการทดลองดังกล่าว สามารถใช้เป็นข้อยืนยันร่วมกับผลการทดลองที่ผ่านมาว่า วิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์โดยตรง (*In situ synthesis*) ในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสก่อนการผสมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์สามารถเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ได้ (Dorozhkin and Eppele 2002)

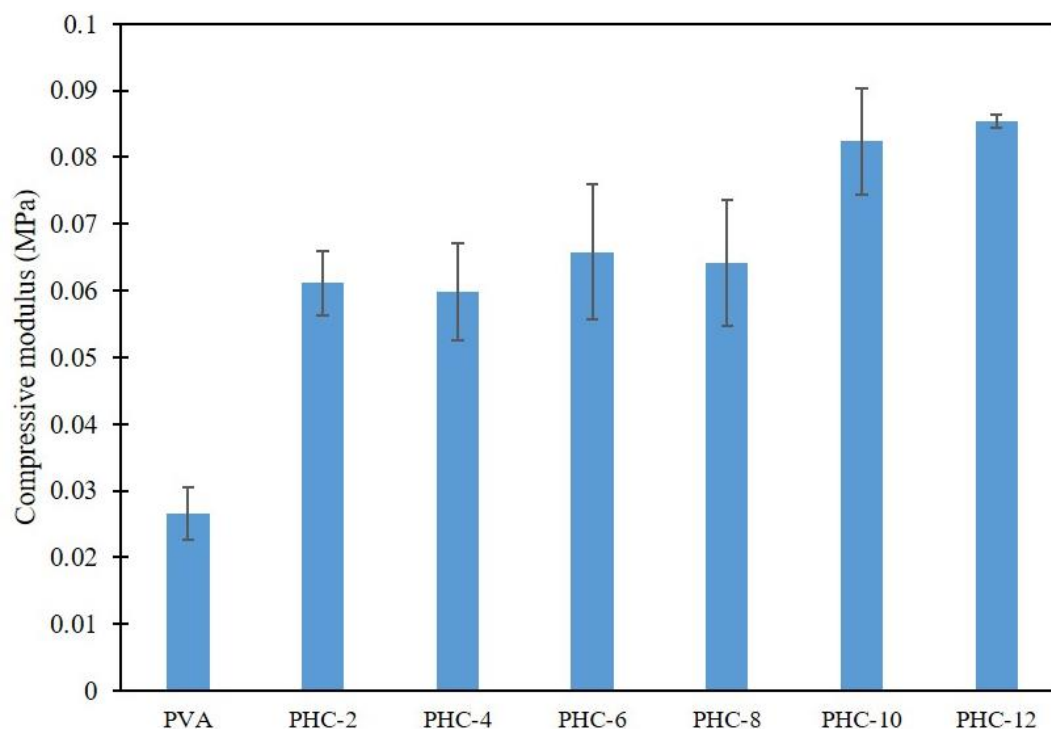


ภาพที่ 47 ลักษณะของการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและไฮดรอกซีแอปปาไทต์ปริมาณต่าง ๆ กำหนดให้ HC (a), PVA (b), PHC-2 (c), PHC-4 (d), PHC-6 (e), PHC-8 (f), PHC-10 (g) and PHC-12 (h)

### 3.2.4 ศึกษาสมบัติทางกลด้วยเครื่องวัดแรงกด (Compressive test)

การศึกษสมบัติทางกลด้วยเครื่องวัดแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ แสดงดังภาพที่ 48 (ความแตกต่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงถึงการสุ่มศึกษาตัวอย่างที่ตำแหน่งแตกต่างกันในตัวอย่าง) จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปปาไทต์ในโครงเลี้ยงเซลล์ พบว่า ค่าโมดูลัสของแรงบีบอัด (compression modulus) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปปาไทต์ร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก มีค่าโมดูลัสของแรงบีบอัดเพิ่มขึ้นร้อยละ 310 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (โครงเลี้ยงเซลล์ที่มีเพียงพอลิไวนิลแอลกอฮอล์) การเพิ่มขึ้นของค่าโมดูลัสของแรงบีบอัดตามปริมาณอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปปาไทต์ สาเหตุเนื่องมาจากสารแขวนลอยที่กระจายตัวในโครงสร้างของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปปาไทต์ยังช่วยทำให้มีความเป็นรูพรุนเพิ่มขึ้นดังภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Avella *et al.*, 2012) โดยการทดลองของงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Avella *et al.* (2012) และ by Kumar *et al.* (2014) ที่สามารถช่วยส่งเสริมสมบัติทางกล (Mechanical properties) เนื่องจากปริมาณของแข็งในตัวอย่างเพิ่มขึ้นนั่นเอง จากผลการทดลองเรื่องคุณสมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ โดยศึกษาและ

รายงานในค่าโมดูลัสของแรงบีบ สามารถยืนยันว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้มีความแข็งแรงที่สามารถประยุกต์ใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ได้จริง



ภาพที่ 48 ค่าทดสอบแรงกด (Compressive modulus) ของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต

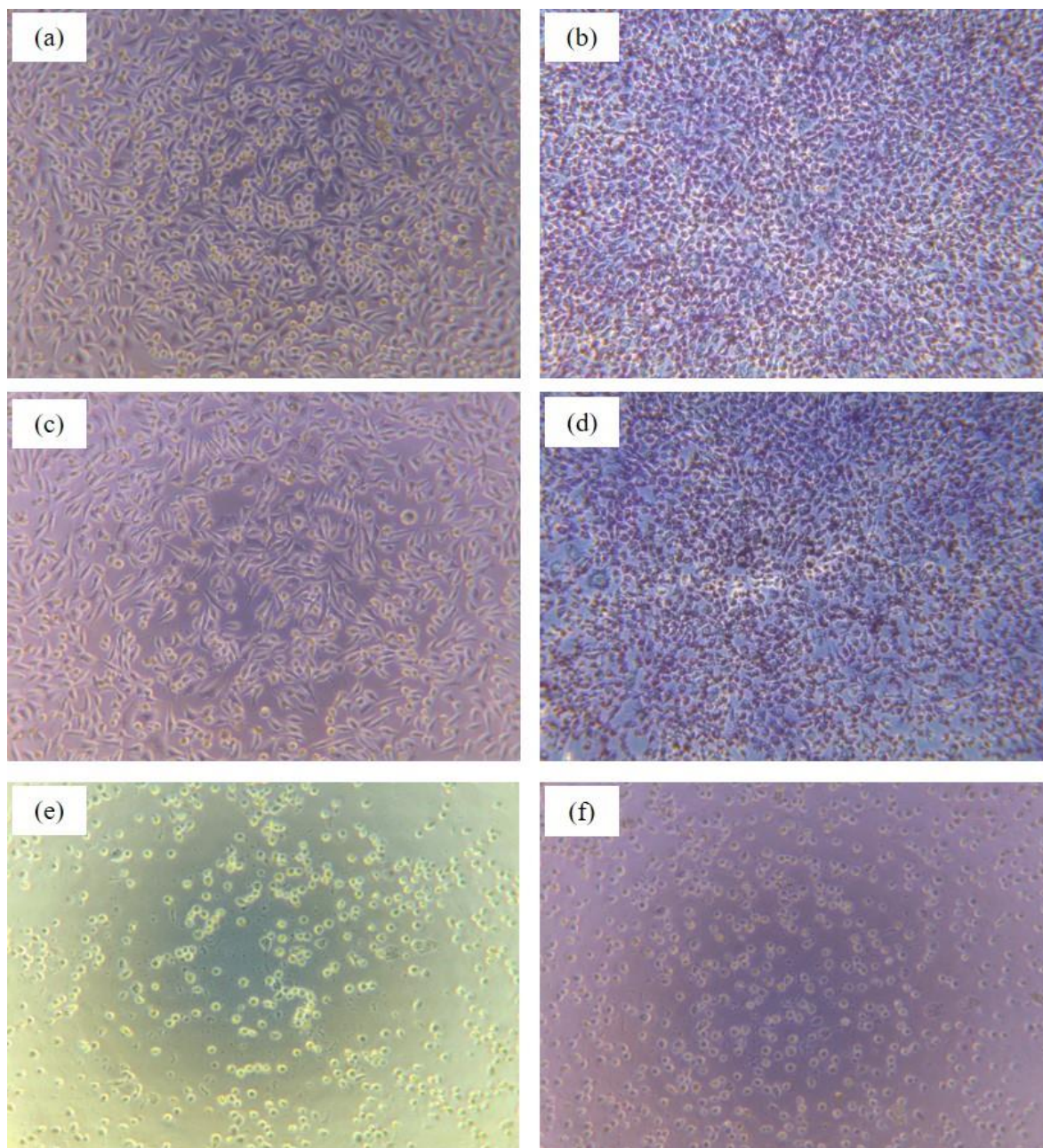
### 3.2.5 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์ได้ เป็นสิ่งจำเป็นและเป็นคุณสมบัติสำคัญของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยงานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ผสมนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ตามวิธีมาตรฐาน ISO standard 10993-5:2009 (E) Annex C (Costa *et al.*, 2007; Lin and Dufresne, 2014) โดยใช้เทคนิค MTT assay ซึ่งทดสอบกับเซลล์ทดสอบ L929 โดยหลังจากบ่มเซลล์ทดสอบ L929 กับตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ปริมาณร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก (PHC-12) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และศึกษาลักษณะของเซลล์ทดสอบ L929 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงดังภาพที่ 49 โดยเปรียบเทียบกับลักษณะเซลล์ทดสอบที่เป็นชุดการทดลองควบคุมเชิงบวก หรือ Positive control (ชุดการทดลองที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)) และชุดการทดลองเชิงลบ หรือ Negative control (ชุดการทดลองที่ไม่มีเป็นพิษต่อเซลล์หรือเซลล์ยังมีชีวิตและเติบโตตามปกติ) โดยค่ามาตรฐานที่แสดงถึงวัสดุ

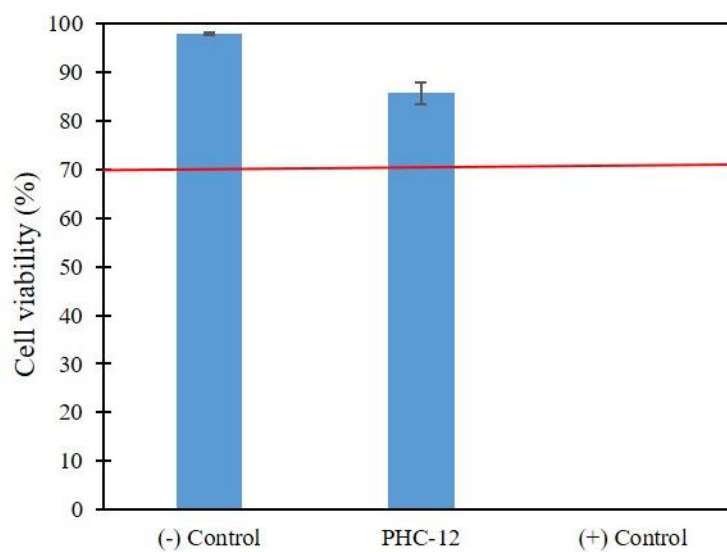
ทดสอบไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จะต้องมีย่อยละปริมาณของเซลล์ทดสอบที่มีชีวิตมากกว่าร้อยละ 70 และไม่มีผลทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ทดสอบเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

โดยหลังจากเซลล์ทดสอบ L929 บ่มร่วมกับตัวอย่างต่างๆ พบว่า ลักษณะเซลล์ทดสอบ L929 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในชุดการทดลองเชิงลบ (ไม่เป็นพิษต่อเซลล์) ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ รูปร่างและการเจริญเติบโตปกติ จากนั้น เมื่อศึกษาลักษณะเซลล์ทดสอบ L929 ที่บ่มร่วมกับตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ปริมาณร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมเชิงลบ (ค่าความเชื่อถือว่า  $p > 0.05$ ) และเมื่อศึกษาและคำนวณร้อยละปริมาณเซลล์ทดสอบที่มีชีวิตของตัวอย่างโครงเลี้ยงเซลล์ แสดงดังภาพที่ 50 พบว่า มีค่าร้อยละปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับร้อยละ  $85.7 \pm 2.15$  ในขณะที่ชุดการทดลองควบคุมเชิงบวก (ชุดการทดลองที่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ) มีค่า เท่ากับ ร้อยละ 0 แสดงถึงการเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบและส่งผลให้เซลล์ทดสอบไม่สามารถเจริญได้

จากผลการวิจัยดังกล่าว พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิต ร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่มีปริมาณนาโนเซลลูโลสและอนุภาคไฮดรอกซีแอปาทิตมากที่สุด ยังคงแสดงคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ L929 ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญที่สามารถต่อยอดในการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป



**ภาพที่ 49** ลักษณะเซลล์ทดสอบ L929 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ที่กำลังขยาย 100 เท่า) โดยกำหนดให้ (a) ชุดการทดลองควบคุมเชิงลบ (c) โครงเลี้ยงเซลล์ PHC-12 และ (e) ชุดการทดลองควบคุมเชิงบวก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และกำหนดให้ (b) กำหนดให้ (b) ชุดการทดลองควบคุมเชิงลบ (d) โครงเลี้ยงเซลล์ PHC-12 (d) และชุดการทดลองควบคุมเชิงบวก (f) หลังจากผ่านกระบวนการ MTT assay



ภาพที่ 50 ค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability) ของโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทไรต์ร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก (เส้นสีแดง คือ ค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตร้อยละ 70)

## บทที่ 5

## สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สามารถแสดงถึงศักยภาพของชานอ้อยที่สามารถพัฒนาและต่อยอดให้เป็นวัสดุทางการแพทย์หรือโครงร่างเลี้ยงเซลล์ที่มีมูลค่าสูง โดยศึกษาการประยุกต์ใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งวัตถุดิบในการสกัดเซลลูโลสและนาโนเซลลูโลส จากนั้น ศึกษาการนำนาโนเซลลูโลสที่สกัดได้จากชานอ้อย ประยุกต์ใช้เพื่อผลิตวัสดุทางการแพทย์ร่วมกับพอลิเมอร์สังเคราะห์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์และทดสอบความเป็นพิษและความเข้ากันได้กับเซลล์ ในส่วนของการสกัดเซลลูโลสและนาโนเซลลูโลสจากชานอ้อย โดยอาศัยวิธีระเบิดด้วยไอน้ำและการฟอกสี ตามลำดับ เพื่อสกัดเซลลูโลสจากชานอ้อยให้มีความบริสุทธิ์สูง จากนั้น นำเซลลูโลสดังกล่าวไปทำปฏิกิริยาการย่อยด้วยกรด เพื่อให้ได้นาโนเซลลูโลส (เส้นใยเซลลูโลสที่มีขนาดนาโนเมตร) จากผลการทดลองพบว่า วิธีการใช้การระเบิดด้วยไอน้ำ และการฟอกสี ตามลำดับ สามารถสกัดเซลลูโลสจากชานอ้อย นอกจากนี้ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การศึกษาโครงสร้างทางเคมี และสมบัติทางความร้อนสามารถยืนยันการที่องค์ประกอบอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลสถูกกำจัดออกไปในระหว่างกระบวนการสกัด และยังคงสมบัติของเซลลูโลสที่ดีไว้ ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่า วิธีการสกัดเซลลูโลสดังกล่าว สามารถเตรียมเซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์สูงอีกทั้งยังสามารถสกัดเซลลูโลสได้ในปริมาณมาก ในส่วนของการเตรียมนาโนเซลลูโลสจากเซลลูโลสด้วยวิธีการย่อยด้วยกรด พบว่า สามารถสกัดนาโนเซลลูโลสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 52-54 นาโนเมตร ความยาวประมาณ 536 นาโนเมตร มีอัตราส่วนของความยาวต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง ( $L/d$ ) เท่ากับ 10 จากนั้น ศึกษาการใช้นาโนเซลลูโลสจากชานอ้อย เพื่อใช้เป็นส่วนผสมสำคัญสำหรับการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โดยศึกษากระบวนการผสมและขึ้นรูปสามวิธี เพื่อหาวิธีที่สามารถทำให้สารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตกระจายตัวได้ดีในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อคุณภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ ใช้ในการวิเคราะห์และศึกษาผลกระทบของสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตต่อโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ด้วยวิธีการผสมและขึ้นรูปต่าง ๆ

วิธีการแช่ (Immersion) โครงเลี้ยงเซลล์ (ที่เตรียมจากสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลส) (ภาพที่ 24) พบว่า จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างทางเคมี การศึกษาลักษณะการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ แสดงให้เห็นว่า เส้นใยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคไฮดรอกซีแอปาทิตสามารถเข้ากันได้ และกระจายตัวในโครงสร้างของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ อย่างไรก็ตาม วิธีการแช่ให้โครงเลี้ยงเซลล์ในสารแขวนลอยของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตนั้น ไม่สามารถทำให้อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอปาทิตกระจายเข้าไปภายในโครงสร้างของโครงเลี้ยงเซลล์ จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโครงร่างเลี้ยงเซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ อนุภาคไฮดรอกซีแอปาทิต และเส้นใยนาโนเซลลูโลส พบว่า ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (มีเซลล์รอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 70) ดังนั้น การศึกษาจึงสามารถยืนยันได้ว่า โครงร่างเลี้ยง

เซลล์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์และเส้นใยนาโนเซลลูโลส สามารถประยุกต์ใช้เป็นวัสดุทางการแพทย์เพื่อใช้ผลิตโครงร่างเลี้ยงเซลล์ได้

เมื่อศึกษาการผสมและขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีที่สอง (ภาพที่ 25) โดยการผสมสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสกับสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ จากนั้น สังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์โดยตรง (*In situ synthesis*) ในสารผสมดังกล่าว จากผลการทดลองพบว่า วิธีดังกล่าวไม่สามารถทำให้อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์กระจายตัวได้ดี เนื่องจากอนุภาคของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และนาโนเซลลูโลสรบกวนกระบวนการก่อตัวของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ทำให้เมื่อขึ้นรูปแล้ว อนุภาคนาดังกล่าวเกิดขึ้นเพียงแค่บางส่วนโครงเลี้ยง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงพัฒนากระบวนการผสมและขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยวิธีที่สาม (ภาพที่ 26) โดยสังเคราะห์อนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ในสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสก่อนที่จะผสมกับสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ เพื่อหลีกเลี่ยงอนุภาคของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ไปรบกวนการก่อตัวของอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ จากผลการทดลอง พบว่า ภาพถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและการศึกษาองค์ประกอบของธาตุด้วยเทคนิค EDS สามารถยืนยันได้ว่ามีอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์เกิดขึ้นและแสดงการกระจายตัวได้ดีในโครงเลี้ยงเซลล์ จากนั้น การศึกษาสมบัติทางกลด้วยเครื่องวัดแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยการเพิ่มขึ้นของสารแขวนลอยนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ยังช่วยทำให้มีความเป็นรูพรุนเพิ่มขึ้นดังภาพถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์ได้ เป็นสิ่งจำเป็นและเป็นคุณสมบัติสำคัญของโครงเลี้ยงเซลล์ โดยงานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นพิษของโครงเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ผสมนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์ ตามวิธีมาตรฐาน ISO standard 10993-5:2009 (E) Annex C พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์จากพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์มากร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่มีปริมาณนาโนเซลลูโลสและอนุภาคนาโนไฮดรอกซีแอพาไทต์มากที่สุด ยังคงแสดงคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ L929 ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญที่สามารถต่อยอดในการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

## บรรณานุกรม

- Abdel-Halim, E.S. 2012. An Effective Redox System for Bleaching Cotton Cellulose. **Carbohydrate Polymers**. 90(1): 316-321.
- Abdul Khalil, H.P.S., A.H. Bhat and A.F. Ireana Yusra. 2012. Green Composites from Sustainable Cellulose Nanofibrils: A Review. **Carbohydrate Polymers**. 87(2): 963-979.
- \_\_\_\_\_, H.P.S., Y. Davoudpour, M.N. Islam, A. Mustapha, K. Sudesh, R. Dungani and M. Jawaid. 2014. Production and Modification of Nanofibrillated Cellulose Using Various Mechanical Processes: A Review. **Carbohydrate Polymers**. 99(0): 649-665.
- Abraham, E., B. Deepa, L.A. Pothan, M. Jacob, S. Thomas, U. Cvelbar and R. Anandjiwala. 2011. Extraction of Nanocellulose Fibrils from Lignocellulosic Fibres: A Novel Approach. **Carbohydrate Polymers**. 86(4): 1468-1475.
- \_\_\_\_\_, B. Deepa, L.A. Pothen, J. Cintil, S. Thomas, M.J. John, R. Anandjiwala and S.S. Narine. 2013. Environmental Friendly Method for the Extraction of Coir Fibre and Isolation of Nanofibre. **Carbohydrate Polymers**. 92(2): 1477-1483.
- Agbor, V.B., N. Cicek, R. Sparling, A. Berlin and D.B. Levin. 2011. Biomass Pretreatment: Fundamentals toward Application. **Biotechnology Advances**. 29(6): 675-685.
- Atalla, R.H. and D.L. Vanderhart. 1984. Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms. **Science**. 223(4633): 283-285.
- Azizi Samir, M.A.S., F. Alloin, J.-Y. Sanchez and A. Dufresne. 2004. Cellulose Nanocrystals Reinforced Poly(Oxyethylene). **Polymer**. 45(12): 4149-4157.
- Bajpai, P. 2012a. Chapter Twelve-Chlorine-Free Bleaching of Secondary Fibers, p. 287-328. In P. Bajpai, eds. **Environmentally Benign Approaches for Pulp Bleaching (Second Edition)**. Elsevier, Boston.

- 
- \_\_\_\_\_, 2012b. Chapter Five-Hydrogen Peroxide Bleaching, p. 97-134. In P. Bajpai, eds. **Environmentally Benign Approaches for Pulp Bleaching (Second Edition)**. Elsevier, Boston.
- Battan, B., J. Sharma, S.S. Dhiman and R.C. Kuhad. 2007. Enhanced Production of Cellulase-Free Thermostable Xylanase by *Bacillus Pumilus* Ash and Its Potential Application in Paper Industry. **Enzyme and Microbial Technology**. 41(6-7): 733-739.
- Beg, Q.K., M. Kapoor, L. Mahajan and G.S. Hoondal. 2001. Microbial Xylanases and Their Industrial Applications: A Review. **Appl Microbiol Biotechnol**. 56(3-4): 326-338.
- Bessueille, L. and V. Bulone. 2008. A Survey of Cellulose Biosynthesis in Higher Plants. **Plant Biotechnology**. 25(3): 315-322.
- Bhattacharya, D., L.T. Germinario and W.T. Winter. 2008. Isolation, Preparation and Characterization of Cellulose Microfibers Obtained from Bagasse. **Carbohydrate Polymers**. 73(3): 371-377.
- Bidlack, J., M. Malone and R. Benson. 1992. Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants, 51-56.
- Bras, J., M.L. Hassan, C. Bruzesse, E.A. Hassan, N.A. El-Wakil and A. Dufresne. 2010. Mechanical, Barrier, and Biodegradability Properties of Bagasse Cellulose Whiskers Reinforced Natural Rubber Nanocomposites. **Industrial Crops and Products**. 32(3): 627-633.
- Buchert, J., M. Tenkanen, A. Kantelinen and L. Viikari. 1994. Application of Xylanases in the Pulp and Paper Industry. **Bioresource Technology**. 50(1): 65-72.
- Cerqueira, D.A., G.R. Filho and C.d.S. Meireles. 2007. Optimization of Sugarcane Bagasse Cellulose Acetylation. **Carbohydrate Polymers**. 69(3): 579-582.
- Chávez, R., P. Bull and J. Eyzaguirre. 2006. The Xylanolytic Enzyme System from the Genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**. 123(4): 413-433.
-

- Chen, X., J. Yu, Z. Zhang and C. Lu. 2011. Study on Structure and Thermal Stability Properties of Cellulose Fibers from Rice Straw. **Carbohydrate Polymers**. 85(1): 245-250.
- Cherian, B.M., A.L. Leão, S.F. de Souza, L.M.M. Costa, G.M. de Olyveira, M. Kottaisamy, E.R. Nagarajan and S. Thomas. 2011. Cellulose Nanocomposites with Nanofibres Isolated from Pineapple Leaf Fibers for Medical Applications. **Carbohydrate Polymers**. 86(4): 1790-1798.
- Chirayil, C.J., J. Joy, L. Mathew, M. Mozetic, J. Koetz and S. Thomas. 2014. Isolation and Characterization of Cellulose Nanofibrils from Helicteres Isora Plant. **Industrial Crops and Products**. 59(0): 27-34.
- Chundawat, S.P.S., G.T. Beckham, M.E. Himmel and B.E. Dale. 2011. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**. 2(1): 121-145.
- Collins, T., C. Gerday and G. Feller. 2005. **Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases**.
- Davis, W.E., A.J. Barry, F.C. Peterson and A.J. King. 1943. X-Ray Studies of Reactions of Cellulose in Non-Aqueous Systems. li. Interaction of Cellulose and Primary Amines1. **Journal of the American Chemical Society**. 65(7): 1294-1299.
- de Jong, E., K.K. Wong and J.N. Saddler. 1997. The Mechanism of Xylanase Prebleaching of Kraft Pulp: An Examination Using Model Pulps Prepared by Depositing Lignin and Xylan on Cellulose Fibers. **Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood**. 51(1): 19-26.
-

- 
- Deepa, B., E. Abraham, B.M. Cherian, A. Bismarck, J.J. Blaker, L.A. Pothan, A.L. Leao, S.F. de Souza and M. Kottaisamy. 2011. Structure, Morphology and Thermal Characteristics of Banana Nano Fibers Obtained by Steam Explosion. **Bioresource Technology**. 102(2): 1988-1997.
- Dong, S., A.A. Hirani, k.r. Colacino, y.w. Lee and m. Roman. 2012. Cytotoxicity and Cellular Uptake of Cellulose Nanocrystals. **Nano Life**. 02(03): 1241006.
- Fan, L. T., M. Gharpuray and Y-H. Lee. 1987. Cellulose hydrolysis. **Springer-Verlag berlin Heidelberg**. London.
- Flauzino Neto, W.P., H.A. Silvério, N.O. Dantas and D. Pasquini. 2013. Extraction and Characterization of Cellulose Nanocrystals from Agro-Industrial Residue–Soy Hulls. **Industrial Crops and Products**. 42(0): 480-488.
- Gardiner, E.S. and A. Sarko. 1985. Packing Analysis of Carbohydrates and Polysaccharides. 16. The Crystal Structures of Celluloses Ivi and Ivii. **Canadian Journal of Chemistry**. 63(1): 173-180.
- Garside, P. and P. Wyeth. 2003. Identification of Cellulosic Fibres by Ftir Spectroscopy-Thread and Single Fibre Analysis by Attenuated Total Reflectance. **Studies in Conservation**. 48(4): 269-275.
- George, J., V.A. Sajeevkumar, R. Kumar, K.V. Ramana, S.N. Sabapathy and A.S. Bawa. 2008. Enhancement of Thermal Stability Associated with the Chemical Treatment of Bacterial (*Gluconacetobacter Xylinus*) Cellulose. **Journal of Applied Polymer Science**. 108(3): 1845-1851.
- Ghanbarzadeh, B., H. Almasi and A.A. Entezami. 2010. Physical Properties of Edible Modified Starch/ Carboxymethyl Cellulose Films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 11(4): 697-702.
-

- 
- Habibi, Y., L.A. Lucia and O.J. Rojas. 2010. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. **Chemical Reviews**. 110(6): 3479-3500.
- Hassan, M.L., J. Bras, E.A. Hassan, C. Silard and E. Mauret. 2014. Enzyme-Assisted Isolation of Microfibrillated Cellulose from Date Palm Fruit Stalks. **Industrial Crops and Products**. 55(0): 102-108.
- Hayashi, J., H. Kon, M. Takai, M. Hatano and T. Nozawa. 1987. The structure of cellulose. **ACS Symp. Ser.** 340: 134-136.
- Henrique, M.A., H.A. Silvério, W.P. Flauzino Neto and D. Pasquini. 2013. Valorization of an Agro-Industrial Waste, Mango Seed, by the Extraction and Characterization of Its Cellulose Nanocrystals. **Journal of Environmental Management**. 121(0): 202-209.
- Hongzhang, C. and L. Liying. 2007. Unpolluted Fractionation of Wheat Straw by Steam Explosion and Ethanol Extraction. **Bioresource Technology**. 98(3): 666-676.
- Jacquet, N., N. Quiévy, C. Vanderghem, S. Janas, C. Blecker, B. Wathelet, J. Devaux and M. Paquot. 2011. Influence of Steam Explosion on the Thermal Stability of Cellulose Fibres. **Polymer Degradation and Stability**. 96(9): 1582-1588.
- Joseleau, J.P., 1992. "Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls". p. 1-15. *In* Visser, J., Beldman, G., Kuster-van Someren, M.A. and Voragen, A.G.J., (eds) Elsevier. **Xylans and xylanases**. Amsterdam.
- Jeong, K., I. Park, M. Kim and S. Kim. 1998. High-Level Expression of an Endoxylanase Gene from Bacillus Sp. In Bacillus Subtilis Db104 for the Production of Xylobiose from Xylan. **Applied microbiology and biotechnology**. 50(1): 113-118.
- Jiang, F. and Y.-L. Hsieh. 2015. Cellulose Nanocrystal Isolation from Tomato Peels and Assembled Nanofibers. **Carbohydrate Polymers**. 122(0): 60-68.
-

- 
- Julien, S., E. Chornet and R.P. Overend. 1993. Influence of Acid Pretreatment (H<sub>2</sub>so<sub>4</sub>, Hcl, Hno<sub>3</sub>) on Reaction Selectivity in the Vacuum Pyrolysis of Cellulose. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. 27(1): 25-43.
- Kaushik, A. and M. Singh. 2011. Isolation and Characterization of Cellulose Nanofibrils from Wheat Straw Using Steam Explosion Coupled with High Shear Homogenization. **Carbohydrate Research**. 346(1): 76-85.
- Khalil, H.P.S.A., H. Ismail, H.D. Rozman and M.N. Ahmad. 2001. The Effect of Acetylation on Interfacial Shear Strength between Plant Fibres and Various Matrices. **European Polymer Journal**. 37(5): 1037-1045.
- Klemm, D., B. Heublein, H.P. Fink and A. Bohn. 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angew Chem Int Ed Engl**. 44(22): 3358-3393.
- \_\_\_\_\_, F. Kramer, S. Moritz, T. Lindström, M. Ankerfors, D. Gray and A. Dorris. 2011. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. **Angewandte Chemie International Edition**. 50(24): 5438-5466.
- Ko, C.-H., Z.-P. Lin, J. Tu, C.-H. Tsai, C.-C. Liu, H.-T. Chen and T.-P. Wang. 2010. Xylanase Production by *Paenibacillus Campinasensis* Bl11 and Its Pretreatment of Hardwood Kraft Pulp Bleaching. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 64(1): 13-19.
- Kumar, P., D.M. Barrett, M.J. Delwiche and P. Stroeve. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. 48(8): 3713-3729.
- Kumar, R., F. Hu, C.A. Hubbell, A.J. Ragauskas and C.E. Wyman. 2013. Comparison of Laboratory Delignification Methods, Their Selectivity, and Impacts on Physiochemical Characteristics of Cellulosic Biomass. **Bioresource Technology**. 130(0): 372-381.
-

- Lavoine, N., I. Desloges, A. Dufresne and J. Bras. 2012. Microfibrillated Cellulose – Its Barrier Properties and Applications in Cellulosic Materials: A Review. **Carbohydrate Polymers**. 90(2): 735-764.
- Lee, S.B., Y.H. Kim, M.S. Chong, S.H. Hong and Y.M. Lee. 2005. Study of Gelatin-Containing Artificial Skin V: Fabrication of Gelatin Scaffolds Using a Salt-Leaching Method. **Biomaterials**. 26(14): 1961-1968.
- Lee, S.-Y., S.-J. Chun, I.-A. Kang and J.-Y. Park. 2009. Preparation of Cellulose Nanofibrils by High- Pressure Homogenizer and Cellulose- Based Composite Films. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. 15(1): 50-55.
- Lee, Y.-J. 2005. **Oxidation of Sugarcane Bagasse Using a Combination of Hypochlorite and Peroxide**. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The Department of Food Science by Yong-Jae Lee B. Sc., Chonnam National University.
- Li, J., X. Wei, Q. Wang, J. Chen, G. Chang, L. Kong, J. Su and Y. Liu. 2012. Homogeneous Isolation of Nanocellulose from Sugarcane Bagasse by High Pressure Homogenization. **Carbohydrate Polymers**. 90(4): 1609-1613.
- Li, M., L.-j. Wang, D. Li, Y.-L. Cheng and B. Adhikari. 2014. Preparation and Characterization of Cellulose Nanofibers from De-Pectinated Sugar Beet Pulp. **Carbohydrate Polymers**. 102(0): 136-143.
- Li, W., Q. Wu, X. Zhao, Z. Huang, J. Cao, J. Li and S. Liu. 2014b. Enhanced Thermal and Mechanical Properties of Pva Composites Formed with Filamentous Nanocellulose Fibrils. **Carbohydr Polym**. 113: 403-410.
-

- Liisa, V., A. Suurnäkki and J. Buchert. 1996. Enzyme-Aided Bleaching of Kraft Pulps: Fundamental Mechanisms and Practical Applications, p. 15-24. In, eds. **Enzymes for Pulp and Paper Processing**. American Chemical Society.
- Lin, N. and A. Dufresne. 2014. Nanocellulose in Biomedicine: Current Status and Future Prospect. **European Polymer Journal**. 59(0): 302-325.
- Liu, C.-F. and R.-C. Sun. 2010. Chapter 5-Cellulose, p. 131-167. In R.-C. Sun, eds. **Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels**. Elsevier, Amsterdam.
- Lu, P. and Y.-L. Hsieh. 2012. Preparation and Characterization of Cellulose Nanocrystals from Rice Straw. **Carbohydrate Polymers**. 87(1): 564-573.
- Maalej-Achouri, I., M. Guerfali, I.B.-B. Romdhane, A. Gargouri and H. Belghith. 2012. The Effect of Talaromyces Thermophilus Cellulase-Free Xylanase and Commercial Laccase on Lignocellulosic Components During the Bleaching of Kraft Pulp. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 75(0): 43-48.
- Mandal, A. and D. Chakrabarty. 2011. Isolation of Nanocellulose from Waste Sugarcane Bagasse (Scb) and Its Characterization. **Carbohydrate Polymers**. 86(3): 1291-1299.
- Manfredi, L. B., E. S. Rodríguez, M. Wladyka-Przybylak and A. Vázquez. 2006. Thermal Degradation and Fire Resistance of Unsaturated Polyester, Modified Acrylic Resins and Their Composites with Natural Fibres. **Polymer Degradation and Stability**. 91(2): 255-261.
- Marrinan, H.J. and J. Mann. 1956. Infrared Spectra of the Crystalline Modifications of Cellulose. **Journal of Polymer Science**. 21(98): 301-311.
-

- 
- Mondragon, G., S. Fernandes, A. Retegi, C. Peña, I. Algar, A. Eceiza and A. Arbelaiz. 2014. A Common Strategy to Extracting Cellulose Nanoentities from Different Plants. **Industrial Crops and Products**. 55(0): 140-148.
- Montane, D., X. Farriol, J. Salvadó, P. Jollez and E. Chornet. 1998. Application of Steam Explosion to the Fractionation and Rapid Vapor-Phase Alkaline Pulping of Wheat Straw. **Biomass and Bioenergy**. 14(3): 261-276.
- Office of the Cane and Sugar Board. Annual report of cane and sugar production year 2012/13 [www.ocsb.go.th](http://www.ocsb.go.th) Date 13 October 2013. Thailand.
- Pecoraro, É., D. Manzani, Y. Messaddeq and S.J.L. Ribeiro. 2007. Chapter 17-Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter Xylinus*: Preparation, Properties and Applications, p. 369-383. In M. N. B. Gandini, eds. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Elsevier, Amsterdam.
- Peng, B.L., N. Dhar, H.L. Liu and K.C. Tam. 2011. Chemistry and Applications of Nanocrystalline Cellulose and Its Derivatives: A Nanotechnology Perspective. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**. 89(5): 1191-1206.
- Peng, F., P. Peng, F. Xu and R.-C. Sun. 2012. Fractional Purification and Bioconversion of Hemicelluloses. **Biotechnology Advances**. 30(4): 879-903.
- Pérez, S. and D. Samain. 2010. Structure and Engineering of Celluloses, p. 25-116. In H. Derek, eds. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. Academic Press.
- Quiévy, N., N. Jacquet, M. Sclavons, C. Deroanne, M. Paquot and J. Devaux. 2010. Influence of Homogenization and Drying on the Thermal Stability of Microfibrillated Cellulose. **Polymer Degradation and Stability**. 95(3): 306-314.
-

- 
- Ray, D., B.K. Sarkar, R.K. Basak and A.K. Rana. 2002. Study of the Thermal Behavior of Alkali-Treated Jute Fibers. **Journal of Applied Polymer Science**. 85(12): 2594-2599.
- Reddy, N. and Y. Yang. 2006. Properties of High-Quality Long Natural Cellulose Fibers from Rice Straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54(21): 8077-8081.
- Roberta, L., P. Farrell and S.Skerker. 1992. Chlorine-Free Bleaching with CARTAZYME [TM] HS Treatment. p. 315-324. *In Visser et al.* (eds.). Xylans and Xylanases. **Elsevier Science**, Amsterdam.
- Rocha, G.J.M., A.R. Gonçalves, B.R. Oliveira, E.G. Olivares and C.E.V. Rossell. 2012. Steam Explosion Pretreatment Reproduction and Alkaline Delignification Reactions Performed on a Pilot Scale with Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. **Industrial Crops and Products**. 35(1): 274-279.
- Roman, M. and W.T. Winter. 2004. Effect of Sulfate Groups from Sulfuric Acid Hydrolysis on the Thermal Degradation Behavior of Bacterial Cellulose. **Biomacromolecules**. 5(5): 1671-1677.
- Roncero, M.B., A.L. Torres, J.F. Colom and T. Vidal. 2005. The Effect of Xylanase on Lignocellulosic Components During the Bleaching of Wood Pulps. **Bioresource Technology**. 96(1): 21-30.
- Rosa, M.F., E.S. Medeiros, J.A. Malmonge, K.S. Gregorski, D.F. Wood, L.H.C. Mattoso, G. Glenn, W.J. Orts and S.H. Imam. 2010. Cellulose Nanowhiskers from Coconut Husk Fibers: Effect of Preparation Conditions on Their Thermal and Morphological Behavior. **Carbohydrate Polymers**. 81(1): 83-92.
- Saha, B. 2003. Hemicellulose Bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 30(5): 279-291.
-

- 
- Salas, C., T. Nypelö, C. Rodriguez-Abreu, C. Carrillo and O.J. Rojas. 2014. Nanocellulose Properties and Applications in Colloids and Interfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. 19(5): 383-396.
- Sarko, A., J. Southwick and J. Hayashi. 1976. Packing Analysis of Carbohydrates and Polysaccharides. 7. Crystal Structure of Cellulose I<sub>III</sub> and Its Relationship to Other Cellulose Polymorphs. **Macromolecules**. 9(5): 857-863.
- Segal, L., J.J. Creely, A.E. Martin and C.M. Conrad. 1959. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**. 29(10): 786-794.
- Shebani, A.N., A.J. van Reenen and M. Meincken. 2008. The Effect of Wood Extractives on the Thermal Stability of Different Wood Species. **Thermochimica Acta**. 471(1-2): 43-50.
- Silvério, H.A., W.P. Flauzino Neto, N.O. Dantas and D. Pasquini. 2013. Extraction and Characterization of Cellulose Nanocrystals from Corn cob for Application as Reinforcing Agent in Nanocomposites. **Industrial Crops and Products**. 44(0): 427-436.
- Sugiyama, J., R. Vuong and H. Chanzy. 1991a. Electron Diffraction Study on the Two Crystalline Phases Occurring in Native Cellulose from an Algal Cell Wall. **Macromolecules**. 24(14): 4168-4175.
- Sugiyama, J., J. Persson and H. Chanzy. 1991b. Combined Infrared and Electron Diffraction Study of the Polymorphism of Native Celluloses. **Macromolecules**. 24(9): 2461-2466.
- Sun, J.X., F. Xu, Z.C. Geng, X.F. Sun and R.C. Sun. 2005a. Comparative Study of Cellulose Isolated by Totally Chlorine-Free Method from Wood and Cereal Straw. **Journal of Applied Polymer Science**. 97(1): 322-335.
- Sun, X.F., R.C. Sun, P. Fowler and M.S. Baird. 2004. Isolation and Characterisation of Cellulose Obtained by a Two- Stage Treatment with Organosolv and Cyanamide Activated Hydrogen Peroxide from Wheat Straw. **Carbohydrate Polymers**. 55(4): 379-391.
-

- 
- \_\_\_\_\_, F. Xu, R.C. Sun, P. Fowler and M.S. Baird. 2005b. Characteristics of Degraded Cellulose Obtained from Steam-Exploded Wheat Straw. **Carbohydrate Research**. 340(1): 97-106.
- Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. **Bioresource Technology**. 83(1): 1-11.
- Techapun, C., N. Poosaran, M. Watanabe and K. Sasaki. 2003. Thermostable and Alkaline-Tolerant Microbial Cellulase-Free Xylanases Produced from Agricultural Wastes and the Properties Required for Use in Pulp Bleaching Bioprocesses: A Review. **Process Biochemistry**. 38(9): 1327-1340.
- Teixeira, E.d.M., T.J. Bondancia, K.B.R. Teodoro, A.C. Corrêa, J.M. Marconcini and L.H.C. Mattoso. 2011. Sugarcane Bagasse Whiskers: Extraction and Characterizations. **Industrial Crops and Products**. 33(1): 63-66.
- Thomas, S., S.A. Paul, L.A. Pothan and B. Deepa. 2011. Natural Fibres: Structure, Properties and Applications, p. 3-42. In S. Kalia, B. S. Kaith and I. Kaur, eds. **Cellulose Fibers: Bio- and Nano-Polymer Composites**. Springer Berlin Heidelberg.
- Tomás-Pejó, E., P. Alvira, M. Ballesteros and M.J. Negro. 2011. Chapter 7-Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion, p. 149-176. In A. P. L. C. R.-G. D. Gnansounou, eds. **Biofuels**. Academic Press, Amsterdam.
- Tonoli, G.H.D., E.M. Teixeira, A.C. Corrêa, J.M. Marconcini, L.A. Caixeta, M.A. Pereira-da-Silva and L.H.C. Mattoso. 2012. Cellulose Micro/Nanofibres from Eucalyptus Kraft Pulp: Preparation and Properties. **Carbohydrate Polymers**. 89(1): 80-88.
- Uma Maheswari, C., K. Obi Reddy, E. Muzenda, B.R. Guduri and A. Varada Rajulu. 2012. Extraction and Characterization of Cellulose Microfibrils from Agricultural Residue–Cocos Nucifera L. **Biomass and Bioenergy**. 46(0): 555-563.
-

- 
- Vieille, C. and G.J. Zeikus. 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 65(1): 1-43.
- Viikari, L., M. Alapuranen, T. Puranen, J. Vehmaanperä and M. Siika-aho. 2007. Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis, p. 121-145. In L. Olsson, eds. **Biofuels**. Springer Berlin Heidelberg.
- Walsh, G.A., R.F. Power and D.R. Headon. 1993. Enzymes in the Animal-Feed Industry. **Trends in Biotechnology**. 11(10): 424-430.
- Wong, K.K.Y. and J.N. Saddler. 1992. Trichoderma Xylanases, Their Properties and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**. 12(5-6): 413-435.
- Wong Sak Hoi, L. and B.S. Martincigh. 2013. Sugar Cane Plant Fibres: Separation and Characterisation. **Industrial Crops and Products**. 47(0): 1-12.
- Yamamoto, H. and F. Horii. 1993. Cpmas Carbon-13 Nmr Analysis of the Crystal Transformation Induced for Valonia Cellulose by Annealing at High Temperatures. **Macromolecules**. 26(6): 1313-1317.
- \_\_\_\_\_, H., F. Horii and H. Odani. 1989. Structural Changes of Native Cellulose Crystals Induced by Annealing in Aqueous Alkaline and Acidic Solutions at High Temperatures. **Macromolecules**. 22(10): 4130-4132.
- Yang, H., R. Yan, H. Chen, D.H. Lee and C. Zheng. 2007. Characteristics of Hemicellulose, Cellulose and Lignin Pyrolysis. **Fuel**. 86(12-13): 1781-1788.
- Yousuf, A. 2012. Biodiesel from Lignocellulosic Biomass–Prospects and Challenges. **Waste Management**. 32(11): 2061-2067.
-

- Yu, H., R. Liu, D. Shen, Y. Jiang and Y. Huang. 2005. Study on Morphology and Orientation of Cellulose in the Vascular Bundle of Wheat Straw. **Polymer**. 46(15): 5689-5694.
- Zhang, F., C. He, L. Cao, W. Feng, H. Wang, X. Mo and J. Wang. 2011. Fabrication of Gelatin-Hyaluronic Acid Hybrid Scaffolds with Tunable Porous Structures for Soft Tissue Engineering. **Int J Biol Macromol**. 48(3): 474-481.
- Zhang, Y.-H.P. and L.R. Lynd. 2004. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 88(7): 797-824.
- Zhao, J., W. Zhang, X. Zhang, X. Zhang, C. Lu and Y. Deng. 2013. Extraction of Cellulose Nanofibrils from Dry Softwood Pulp Using High Shear Homogenization. **Carbohydrate Polymers**. 97(2): 695-702.
- Zuluaga, R., J.L. Putaux, J. Cruz, J. Vélez, I. Mondragon and P. Gañán. 2009. Cellulose Microfibrils from Banana Rachis: Effect of Alkaline Treatments on Structural and Morphological Features. **Carbohydrate Polymers**. 76(1): 51-59.
- Zykwinska, A.W., M.-C.J. Ralet, C.D. Garnier and J.-F.J. Thibault. 2005. Evidence for in Vitro Binding of Pectin Side Chains to Cellulose. **Plant Physiology**. 139(1): 397-407.
-