

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานประมาณแผ่นดินที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2553 และ 2554 ทำให้สามารถทำงานวิจัยชิ้นนี้ได้สำเร็จ ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. ดวงใจ นักวิจัยที่ปรึกษา ที่ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดต่าง ๆ ในการทำวิจัย และขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย และนักศึกษาในโครงการทุกท่านที่ได้ช่วยเสนอความคิด และได้ทำงานวิจัยอย่างเต็มที่ ทำให้งานวิจัยและการนำเสนอผลงานในระดับต่าง ๆ ประสบความสำเร็จด้วยดี

สารบัญ

บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)	i
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	
2.1 Enzyme-based biofuel cell	8
2.2 Laccase-based biocathodes	9
2.3 Glucose oxidase-based bioanodes	13
บทที่ 3 การทดลอง	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	16
Cyclic voltammetry and amperometry	
3.2 การพัฒนาขั้วไบโอแคโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ ที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen (O_2) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ (H_2O) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase	19
3.3 การพัฒนาขั้วไบโอแอโนดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ ที่มีประสิทธิภาพในการ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส	21
3.3.1 การพัฒนาขั้วไบโอแอโนดโดยใช้โพลิเมอร์ชนิด polyaniline (co-m-ferrocenylaniline) ในการตรึง เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	21
3.3.2 การพัฒนาขั้วไบโอแอโนดโดยใช้นาโนคอมโพสิตของคาร์บอนนาโน ทิวบ์และไคโตซานในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	23
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 การพัฒนาขั้วไบโอแคโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มี ประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen (O_2) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ (H_2O) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase	26
4.1.1 การศึกษาหาค่าประจุที่เหมาะสมของไบโอแคโทด	26
4.1.2 การศึกษาหาค่าประจุสลายที่ใช้โมดิฟายด์ขั้วไฟฟ้า กลาสซีคาร์บอนและสภาวะที่เหมาะสมของการวัดค่ากระแส รีดักชันของออกซิเจน	28

สารบัญ (ต่อ)

4.13 การศึกษาสัญญาณการตอบสนองของชีวไฟฟ้า	32
GC/CNT-CS/laccase/BSA ต่อปริมาณแก๊สออกซิเจน	
4.14 ศึกษาความเสถียรของไบโอเซนเซอร์	33
4.2 การพัฒนาชีวไบโอแอโนดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ	34
ที่มีประสิทธิภาพในการ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส	
4.2.1 การพัฒนาชีวไบโอแอโนดโดยใช้โพลีเมอร์ชนิด	34
polyaniline (co-m-ferrocenylaniline) ในการตรึง	
เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	
4.2.1.1 ศึกษาหาค่าประกอบที่เหมาะสมของไบโอแอโนด	34
4.2.1.2 ศึกษาผลของปริมาณอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs)	36
ในการโม่ติฟายด์ชีวไฟฟ้า	
4.2.1.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย	36
PFcANi ในการโม่ติฟายด์ชีวไฟฟ้า	
4.2.1.4 ศึกษาผลของความเข้มข้นของโคโคซานที่ใช้ในการโม่ติฟายด์	37
ชีวไฟฟ้า	
4.2.1.5 ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GOx)	38
4.2.1.6 ศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือ	39
4.2.1.7 การศึกษาคุณลักษณะของกลูโคสไบโอเซนเซอร์	40
4.2.1.8 การสังเคราะห์ poly(aniline-co-m-ferrocenylaniline)	43
ด้วยวิธีการทางไฟฟ้า	
4.2.2 การพัฒนาชีวไบโอแอโนดโดยใช้นาโนคอมโพสิตของคาร์บอนนา	45
โนทิวบ์ และโคโคซานในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	
4.2.2.1 การศึกษาหาค่าประกอบที่เหมาะสมของไบโอแอโนด	45
4.2.2.2 ศึกษาหาเมดิเอเตอร์ที่เหมาะสม	47
4.2.2.3 การศึกษาหาชนิดของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่เหมาะสม	49
4.2.2.4 การเพิ่มประสิทธิภาพของชีวไบโอแอโนดโดยการตรึง FcCHO ใน	50
คาร์บอนนาโนทิวบ์ด้วยการดูดซับทางกายภาพร่วมกับวิธีการทางเคมี	
4.2.2.5 การศึกษาคุณลักษณะกลูโคสไบโอเซนเซอร์	52
4.2.2.6 การศึกษาความเสถียรของไบโอแอโนด	53
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	54
เอกสารอ้างอิง	55



บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)

ชื่อโครงการวิจัย การพัฒนาไบโอแคโทดและไบโอแอโนดชนิดใหม่โดยใช้เอนไซม์เพื่อการประยุกต์ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ

Development of new enzyme-based biocathode and bioanodes for fuel cell application.

ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2553 จำนวนเงิน 445,000 บาท

ประจำปีงบประมาณ 2554 จำนวนเงิน 528,000 บาท

ระยะเวลาการดำเนินงาน 2 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2552 ถึง กันยายน 2554

รายนามหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมดำเนินการวิจัย

1) ดร. มะลิวรรณ อมตธงไชย 2) ดร. เสนอ ชัยรัมย์ 3) น.ส. เสาวนีย์ เหล่าสิงห์
ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ผศ.ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา

โครงการวิจัยนี้ศึกษาและพัฒนาชีวไฟฟ้าชนิดใหม่ๆ โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนด้วยกัน ส่วนแรกพัฒนาชีวไบโอแคโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen (O_2) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ (H_2O) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase และงานวิจัยส่วนที่สองศึกษาและพัฒนาชีวแอโนด โดยการพัฒนาระบบการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยใช้ตัวนำส่งอิเล็กตรอน (mediator) ที่เป็นโพลิเมอร์นำไฟฟ้า หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าตัวนำส่งหลายชนิดที่ใช้กัน biocatalyst ที่จะใช้ในชีวไบโอแอโนดคือ glucose oxidase และใช้การโมดิฟายด์ด้วยโพลิเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ ช่วยให้การนำส่งอิเล็กตรอนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยในการ catalyze ให้ glucose เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้ดีขึ้น ชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดและไบโอแอโนดชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้เมื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือการพัฒนาชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดชนิดใหม่ และการพัฒนาชีวไฟฟ้าไบโอแอโนดชนิดใหม่ โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

การพัฒนาชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดชนิดใหม่

1) ศึกษาและพัฒนาชีวไบโอแคโทดเพื่อหาองค์ประกอบของ nano composites และเอนไซม์ที่เหมาะสมของ biocatalyst ในการการ catalyze ปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen (O_2) ไปเป็นเป็นน้ำ (H_2O)

2) พัฒนาเทคนิคในการตรึง (immobilize) เอนไซม์ลงบน nano composites เพื่อใช้เป็น biocatalyst ในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen (O_2) ไปเป็นเป็นน้ำ (H_2O) โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมได้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นขั้วไบโอแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพและให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้นได้

3) ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ biocatalyst ที่พัฒนาขึ้น เช่น ผลของปริมาณ carbon nanotube (CNT) ที่ใช้, ความจุของเอนไซม์ (enzyme loading) และความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability)

4) ประเมินคุณลักษณะของขั้วไบโอแคโทดที่พัฒนาขึ้น โดยการเปรียบเทียบการนำไปใช้ในการ catalyze ปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen

การพัฒนาขั้วไฟฟ้าไบโอแอโนดชนิดใหม่

1) ศึกษาและพัฒนาขั้วไบโอแอโนดเพื่อหาองค์ประกอบของขั้วไฟฟ้าที่เหมาะสม โดยศึกษาถึงปริมาณ เอนไซม์ที่เหมาะสมในการ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส เพื่อให้ได้สารตัวกลางทางไฟฟ้าซึ่งก็คือ H_2O_2

2) ศึกษาการทำงานของขั้วไฟฟ้าไบโอแอโนดที่พัฒนาขึ้น โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry และ hydrodynamic amperometry

3) ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพของไบโอแอโนดที่พัฒนาขึ้น เช่น ชนิดของสารนำส่งอิเล็กตรอน จำพวกโพลิเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์, ปริมาณของ substrate, ระบบบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์, ศักยภาพไฟฟ้าที่เหมาะสม, ความแม่นยำของขั้วไฟฟ้าและอายุการใช้งานของขั้วไฟฟ้า

4) ประเมินคุณลักษณะของขั้วไบโอแอโนดที่พัฒนาขึ้น ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของ glucose ไปเป็น gluconolactone และสารตัวกลางไฟฟ้า (H_2O_2)

5) ประยุกต์ขั้วไฟฟ้าทั้งสองชนิดที่ได้พัฒนาขึ้นนำมาเชื่อมต่อกันเพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของ เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้พัฒนาขึ้น รวมทั้งศึกษาเบื้องต้นถึงระยะเวลาการใช้งานและเสถียรภาพของ Biofuel cell ที่ได้พัฒนาขึ้น

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ศึกษาและพัฒนาชีวไฟฟ้าชนิดใหม่ๆ โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนด้วยกัน ส่วนแรกพัฒนาชีวไบโอแคโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำ $\text{dioxygen (O}_2\text{)}$ เกิด $\text{electro-enzymatic reduction}$ เป็นน้ำ (H_2O) โดยใช้วัสดุเชิงประกอบระดับนาโนของเอนไซม์แลคเคส งานวิจัยส่วนนี้ได้พัฒนาสภาพและความจำเพาะเจาะจงของไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน โดยการตรึงเอนไซม์แลคเคสในฟิล์มของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน เอนไซม์แลคเคสถูกตรึงบนพื้นผิวของชีวไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนบนวัสดุเชิงประกอบของคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานและสารละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน ทำให้สามารถใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดออกซิเจน ได้ศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ในสารละลายซีเทรต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ที่ใช้เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกือบอิ่มตัว โดยใช้ชีวไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นชีวไฟฟ้าทำงาน ชีวไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์เป็นชีวไฟฟ้าอ้างอิง และแพลทินัมเป็นชีวไฟฟ้าช่วยพบว่าออกซิเจนเกิดรีดักชันที่ศักย์ไฟฟ้า -0.35 โวลต์ (เมื่อเทียบกับ Ag/AgCl) จากการศึกษาความเสถียร พบว่าชีวไบโอแคโทดที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรมาก

งานวิจัยส่วนที่สองศึกษาและพัฒนาชีวแอโนด โดยการพัฒนากระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยใช้ตัวนำส่งอิเล็กตรอน (mediator) ที่เป็นโพลิเมอร์นำไฟฟ้าชนิด polyaniline (co-*m*-ferrocenylaniline) หรือ PFCAni และคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าตัวนำส่งหลายชนิดที่ใช้กัน biocatalyst ที่จะใช้ในชีวไบโอแอโนดคือ กลูโคสออกซิเดสและใช้การโมดิฟายด์ด้วยโพลิเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ ช่วยให้การนำส่งอิเล็กตรอนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสได้ดีขึ้น ชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดและไบโอแอโนดชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้เมื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้

Key words: ไบโอแคโทด, ไบโอแอโนด, เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ, แลคเคส, กลูโคสออกซิเดส

Abstract

This work presents a new approach for developing new enzyme-based bioanode and biocathodes for fuel cell application. The work consists of two parts. In the first part, biocathode using an effective biocatalyst to catalyse dioxygen reduction to water was developed. Laccase enzyme was entrapped in carbon nanotubes-chitosan (CNT-CS) composite film for detection of oxygen reduction. The nano-composite of CNT-CS could be conveniently cast on the glassy carbon (GC) electrode surfaces. With the aid of the CNT-CS composite and bovine serum albumin (BSA), laccase was then immobilized on the nanostructure film to form an oxygen sensor. Electrochemical reduction of oxygen was studied at the developed biosensor using cyclic voltammetry (CV). The GC/CNT-CS/laccase/BSA electrode was used as a working electrode, Ag/AgCl as a reference electrode and Pt wire as a counter electrode. Cyclic voltammograms of oxygen were measured in a 0.1 M citrate buffer pH 5.0. The reduction wave was observed at -0.35 V (Vs Ag/AgCl). The results from stability study showed that the developed biocathode provided satisfactory stable.

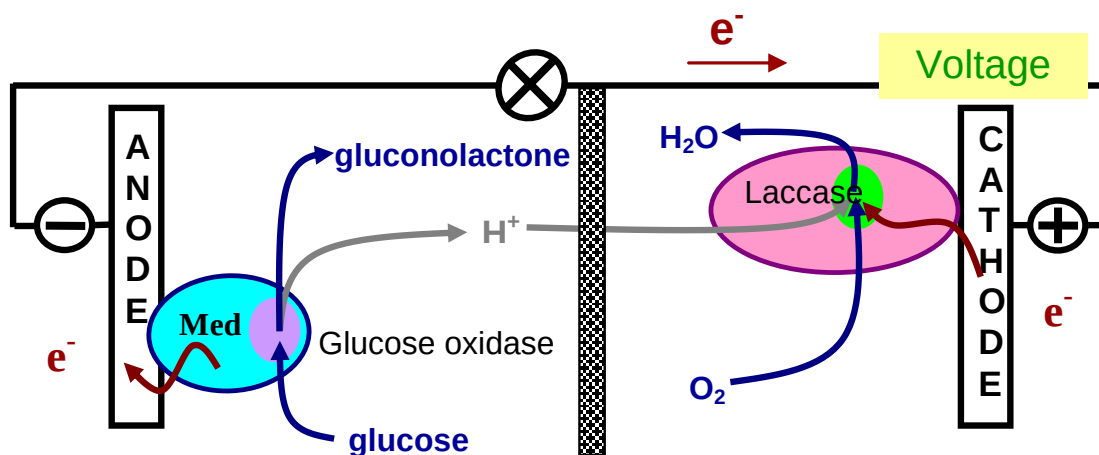
In the second part of this work, effective electron transferring matrices for mediator was developed using nanocomposites of polyaniline (co-*m*-ferrocenylaniline) or PFCANI and carbon nanotubes. These matrices were utilized to improve performance of glucose oxidase to catalyse glucose oxidation reaction. The developed biocathode and bioanodes are potential candidates for the development of efficient biofuel cells

Key words: biocathode, bioanode, biofuel cell, laccase, glucose oxidase

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาและพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงทางชีวภาพเพื่อเป็นพลังงานทดแทนอีกทางเลือกหนึ่ง โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาและพัฒนาชีวไฟฟ้าชนิดใหม่ๆ โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ (ดังรูปที่ 1) โดยจะแบ่งงานออกเป็น 2 ส่วนด้วยกัน ส่วนแรก จะพัฒนาชีวไบโอแคโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen (O_2) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ (H_2O) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase และงานวิจัยในส่วนที่สอง จะศึกษาและพัฒนาชีวแอโนด โดยการพัฒนาระบบการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยใช้ตัวนำส่งอิเล็กตรอน (mediator) ที่เป็นสารจำพวกโพลิเมอร์ หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าตัวนำส่งหลายชนิดที่ใช้กัน biocatalyst ที่จะใช้ในชีวไบโอแอโนดคือ glucose oxidase และใช้การโมดิฟายด้วยโพลิเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ ช่วยให้การนำส่งอิเล็กตรอนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยในการ catalyze ให้ glucose เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้ดีขึ้น โดยคาดว่าชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดและไบโอแอโนดชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้เมื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นการใช้ประโยชน์จากเชื้อเพลิงชีวภาพอย่างสูงสุด และเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการพัฒนาเพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทย เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย ฯลฯ



รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่โครงการวิจัยนี้จะพัฒนาขึ้น โดยส่วนที่ 1 จะพัฒนาไบโอแคโทดโดยตรึงด้วย nano composite ของเอนไซม์ laccase และส่วนที่ 2 จะพัฒนาไบโอแอโนดโดยตรึงเอนไซม์ glucose oxidase ที่ชีวแอโนดที่มี mediator เป็นพวกโพลิเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ ทำหน้าที่นำส่งอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นแก่ชีวไฟฟ้า

1.2 วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือการพัฒนาชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดชนิดใหม่ และการพัฒนาชีวไฟฟ้าไบโอแอโนดชนิดใหม่ โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

การพัฒนาชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดชนิดใหม่

- 1) ศึกษาและพัฒนาชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดเพื่อหาค่าประกอบของ nano composites และเอนไซม์ที่เหมาะสมของ biocatalyst ในการการ catalyze ปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen (O_2) ไปเป็นเป็นน้ำ (H_2O)
- 2) พัฒนาเทคนิคในการตรึง (immobilize) เอนไซม์ลงบน nano composites เพื่อใช้เป็น biocatalyst ในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen (O_2) ไปเป็นเป็นน้ำ (H_2O) โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมได้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้ชีวไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพและให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้นได้
- 3) ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ biocatalyst ที่พัฒนาขึ้น เช่น ผลของปริมาณ carbon nanotube (CNT) ที่ใช้, ความจุของเอนไซม์ (enzyme loading) และความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability)
- 4) ประเมินคุณลักษณะของชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดที่พัฒนาขึ้น โดยการเปรียบเทียบการนำไปใช้ในการ catalyze ปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen

การพัฒนาชีวไฟฟ้าไบโอแอโนดชนิดใหม่

- 1) ศึกษาและพัฒนาชีวไฟฟ้าไบโอแอโนดเพื่อหาค่าประกอบของชีวไฟฟ้าที่เหมาะสม โดยศึกษาถึงปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส เพื่อให้ได้สารตัวกลางทางไฟฟ้าซึ่งก็คือ H_2O_2
- 2) ศึกษาการทำงานของชีวไฟฟ้าไบโอแอโนดที่พัฒนาขึ้น โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry และ hydrodynamic amperometry
- 3) ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพของไบโอแอโนดที่พัฒนาขึ้น เช่นชนิดของสารนำส่งอิเล็กตรอน จำพวก โพลีเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ , ปริมาณของ substrate, ระบบบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, ศักยภาพไฟฟ้าที่เหมาะสม, ความแม่นยำของชีวไฟฟ้าและอายุการใช้งานของชีวไฟฟ้า
- 4) ประเมินคุณลักษณะของชีวไฟฟ้าไบโอแอโนดที่พัฒนาขึ้น ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของ glucose ไปเป็น gluconolactone และสารตัวกลางไฟฟ้า (H_2O_2)
- 5) ประยุกต์ชีวไฟฟ้าทั้งสองชนิดที่ได้พัฒนาขึ้นนำมาเชื่อมต่อกันเพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้พัฒนาขึ้น รวมทั้งศึกษาเบื้องต้นถึงระยะเวลาการใช้งานและเสถียรภาพของ Biofuel cell ที่ได้พัฒนาขึ้น

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เมื่อทำงานวิจัยเสร็จแล้วผลที่คาดว่าจะได้รับคือ

1. ได้ชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดและไบโอแอโนดชนิดใหม่ ที่สามารถนำไปในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพและให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้นได้

1.1 ชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดชนิดใหม่ ที่พัฒนาขึ้นจากการตรึงเอนไซม์ลงบน nano composites ให้เป็น biocatalyst ในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen (O_2) ไปเป็นน้ำ (H_2O) โดยคาดว่า nano structured biocatalysts ที่เตรียมขึ้นมานี้จะมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading), ความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) และความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนสูง ทำให้อิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นชีวไบโอแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพและให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้นได้

1.2 ชีวไฟฟ้าไบโอแอโนดชนิดใหม่ ที่พัฒนามาจากวิธีการตรึงเอนไซม์ กลูโคสออกซิเดสบนโพลิเมอร์ หรือ carbon nanotube ซึ่งสารเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน โดยคาดว่าเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ตรึงบนโพลิเมอร์จะ catalyze สารละลายกลูโคสทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารตัวกลางทางไฟฟ้า (H_2O_2) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อมีการให้ศักย์ที่เหมาะสม เกิดการไหลของอิเล็กตรอน โพลิเมอร์ที่ใช้จะทำหน้าที่เป็นตัวตรึงเอนไซม์ และในขณะเดียวกันก็เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน ชีวไฟฟ้าไบโอแอโนดที่พัฒนาจะเป็นชีวไฟฟ้าที่มีประสิทธิภาพในการนำส่งอิเล็กตรอนสูง

2. ผลงานที่ได้พัฒนาขึ้นจะถูกถ่ายทอดสู่กลุ่มเป้าหมาย โดยการนำผลการทดลองที่ได้ไปแสดงหรือบรรยายในที่ประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ หรือนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

3. ได้องค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาศักยภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทย เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย ฯลฯ รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้กับภาคอุตสาหกรรมที่ต้องการนำเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นไปผลิตเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพให้มีประสิทธิภาพในการให้กำลังไฟฟ้าที่สูงขึ้น และ/หรือสามารถนำไปใช้ในการย่อขนาดให้เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพให้มีขนาดเล็กลงได้

4. เพื่อจัดทำฐานข้อมูลและเผยแพร่ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อใช้เป็นพลังงานทางเลือก หน่วยงานที่คาดว่าจะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

-คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

-คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

-อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ และ อุตสาหกรรมผลิตเชื้อเพลิง (Fuel) ที่ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น กลูโคส, เอทานอล ฯลฯ ที่ใช้ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทย เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย ฯลฯ เป็นวัตถุดิบ

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษาและพัฒนาชีวไฟฟ้าชนิดใหม่ ๆ เพื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยจะแบ่งงานออกเป็น 2 ส่วนด้วยกันคือส่วนแรกจะพัฒนาคือการพัฒนาชีวไบโอแคโทด ชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำ dioxygen (O_2) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ (H_2O) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase และงานวิจัยในส่วนที่สองจะศึกษาและพัฒนาชีวไบโอ

แอโนดที่ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพโดยจะพัฒนากระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยใช้ตัวนำส่งอิเล็กตรอน (mediator) ที่เป็นสารจำพวกโพลีเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าตัวนำส่งหลายชนิดที่ใช้กัน biocatalyst และตรึงเอนไซม์ glucose oxidase บนโพลีเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ ทำหน้าที่เป็น mediator ดังนั้นจึงคาดว่าชีวไฟฟ้าไบโอแคโทดและไบโอแอโนดชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้เมื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเป็นการใช้ประโยชน์จากเชื้อเพลิงชีวภาพอย่างสูงสุด และเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการนำเชื้อเพลิงชีวภาพมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนพลังงานจากฟอสซิล อีกทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่มีศักยภาพอย่างยิ่งในการพัฒนาให้เป็นพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) เนื่องจากใช้พลังงานจากออกซิเจนซึ่งมีอยู่แล้วในอากาศทั่วไปและกลูโคสที่สามารถหาได้จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีอยู่ในท้องถิ่น เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย ฯลฯ

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร (Literature Reviews)

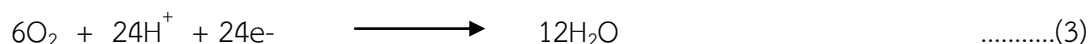
เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพคือเครื่องมือที่เปลี่ยนสารทางเคมีอินทรีย์เป็นไฟฟ้าโดยใช้ microorganism เช่น เอนไซม์หรือแบคทีเรีย เป็นสารเร่งปฏิกิริยาให้เป็นงานทางไฟฟ้า¹ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ของกระบวนการคือ โปรตรอน อิเล็กตรอน เป็นต้น โดยโปรตรอนและอิเล็กตรอนที่ได้ถูกนำไปใช้ในการแปลงเป็นพลังงาน เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ จึงเป็นแหล่งกำเนิดไฟฟ้ารูปแบบใหม่เพื่อทดแทนพลังงานที่มาจากฟอสซิลหรือเชื้อเพลิงชนิดอื่น งานวิจัยเกี่ยวกับ เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเริ่มจากปี ค.ศ.1911 โดย Potter² และในปี ค.ศ. 1991 Benetto และคณะ³ ได้สร้าง แบบจำลองที่พิสูจน์ว่าจุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในการผลิตพลังงานได้โดยใช้ E.Coli เป็นจุลินทรีย์และใช้กลูโคส เป็นเชื้อเพลิง ซึ่งกระบวนการเผาผลาญกลูโคสดังแสดงในสมการ (1)



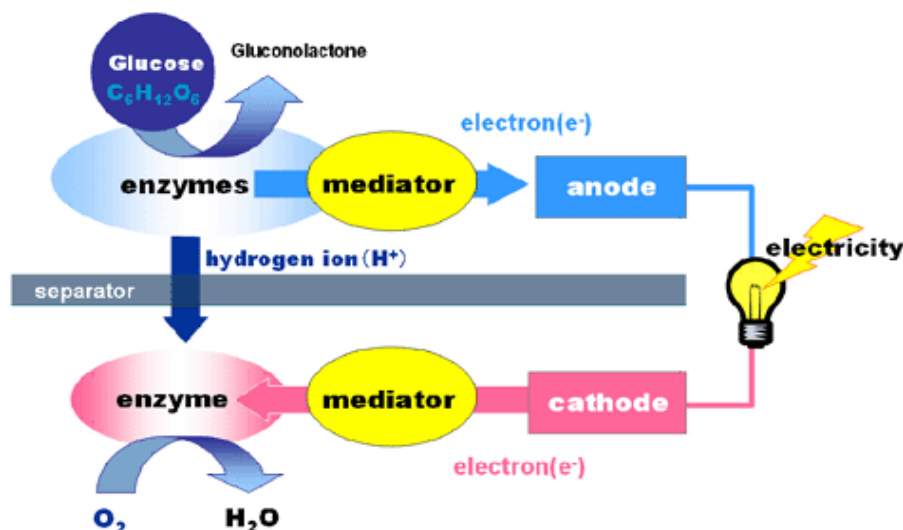
กระบวนการเผาผลาญอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ของวัฏจักรเครบส์จะได้ผลผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ โปรตรอน และอิเล็กตรอน ดังสมการ (2)



จากนั้นโปรตรอนและอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังระบบถ่ายเทอิเล็กตรอน เพื่อรวมตัวกับออกซิเจน ทำให้ กระบวนการเผาผลาญสารอาหารเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และให้ผลผลิตเป็นน้ำ ดังสมการที่ (3)



จากสมการที่ (2) และ (3) สามารถนำมาปรับปรุงใช้เป็นเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้าแอโนดและ แคโทดที่กั้นกลางด้วยเมมเบรน โดยโปรตรอนที่เกิดขึ้นจากขั้วแอโนดจะแพร่ผ่านเมมเบรนแลกเปลี่ยน ส่วน อิเล็กตรอนไหลผ่านวงจรภายนอกเซลล์ เมื่อเกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนก็จะเกิดกระแสไฟฟ้าทำให้เกิด งานขึ้น เมื่อนำเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพไปต่อกับหลอดไฟฟ้าก็จะทำให้หลอดสว่างได้ หลักการทำงานและ ส่วนประกอบของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพแสดงได้ดังรูปที่ 2.1



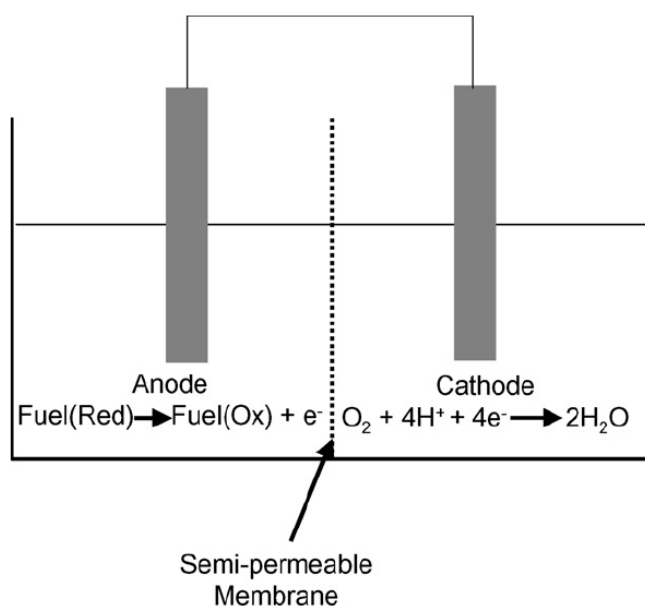
รูปที่ 2.1 รูปแสดงส่วนประกอบเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ⁴

จากหลักการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพพบว่า มีตัวแปรหลายตัวแปรที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ ได้แก่ โครงสร้างของเซลล์ ชนิดของเมมเบรน ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ ตัวนำส่งอิเล็กตรอนหรือ mediator ชนิดและขนาดของอิเล็กโทรด และยังมีปัจจัยภายนอกเซลล์ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเป็นเบสของสารละลายในส่วนของแอโนดและแคโทด

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานไฟฟ้าทางเลือกรูปแบบใหม่ โดยจะศึกษาและพัฒนาความเป็นไปได้ที่จะนำเซลล์เชื้อเพลิงจากชีวภาพมาผลิตเป็นพลังงานไฟฟ้าในอัตราที่สูง และศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาให้เป็นเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพขนาดเล็กจากเอนไซม์ที่สามารถให้กำเนิดพลังงานไฟฟ้าที่ใช้สำหรับอุปกรณ์ไฟฟ้าขนาดเล็ก งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษาและพัฒนาชีวไฟฟ้าชนิดใหม่ ๆ เพื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยจะแบ่งงานออกเป็น 2 ส่วนด้วยกัน คือ ส่วนแรกจะพัฒนาชีวไบโอแคโทด งานวิจัยในส่วนนี้จะศึกษาและพัฒนาชีวแคโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen (O_2) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ (H_2O) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase การตรึงเอนไซม์ลงบนพื้นผิวของคาร์บอนนาโนทิวบ์ (carbon nanotube; CNT) ซึ่งเป็นวัสดุที่มีลักษณะที่เด่นเป็นพิเศษคือ มีพื้นที่ผิวมาก, สามารถบรรจุอะตอม หรือโมเลกุลชนิดอื่นไว้ภายในท่อได้และมีสภาพนำไฟฟ้าที่สูง⁵ จึงคาดว่า biocatalyst ที่เตรียมขึ้นได้จะสมบัติพิเศษคือมีความจุของเอนไซม์ (enzyme loading) และความคงตัวของเอนไซม์ (enzyme stability) สูง ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ biocatalyst ที่เป็นการต้องการอย่างยิ่งในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ และในส่วนที่สองจะพัฒนาชีวไบโอแอโนดที่ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและส่งผ่านอิเล็กตรอนที่ชีวไฟฟ้าแอโนดปรับปรุงโดยตรึงเอนไซม์ glucose oxidase โดยมี glucose เป็น substrate การส่งผ่านอิเล็กตรอนจะใช้ตัวนำส่งอิเล็กตรอน (mediator) ที่เป็นสารจำพวกโพลีเมอร์หรือคาร์บอนนาโนทิวบ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าตัวนำส่งหลายชนิดที่ใช้อยู่ทั่วไป biocatalyst ที่พัฒนานี้ขึ้นคาดว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งผ่านอิเล็กตรอนในการ catalyze ให้ glucose เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นจึงคาดว่าชีวไฟฟ้าไบโอแอโนดและไบโอแคโทดชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้ เมื่อนำมาใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเป็นการใช้ประโยชน์จากเชื้อเพลิงชีวภาพอย่างสูงสุด และเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการนำเชื้อเพลิงชีวภาพมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนพลังงานจากฟอสซิล อีกทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่มีศักยภาพอย่างยิ่งในการพัฒนาให้เป็นพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) เนื่องจากใช้พลังงานจากออกซิเจนซึ่งมีอยู่แล้วในอากาศทั่วไปและกลูโคสที่สามารถหาได้จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีอยู่ในท้องถิ่น ประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศที่ทำเกษตรกรรมเป็นหลักจึงมีศักยภาพในการนำวัตถุดิบที่มีอยู่ในประเทศมาใช้ในการผลิตเพื่อเป็นเชื้อเพลิงที่ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ ทั้งในระดับชุมชนและระดับอุตสาหกรรม การพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งใช้วัตถุดิบที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้เองในประเทศ มาใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทน จึงช่วยในการรักษาเงินตราต่างประเทศ เป็นการสร้างความมั่นคง และสามารถพึ่งพาตนเองด้านพลังงานของประเทศอีกด้วย

แผนภาพทั่วไปของการทำงานแสดงดังรูปที่ 2.2 เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพประกอบด้วยชีวไฟฟ้าแอโนดและแคโทดซึ่งถูกแยกออกจากกันด้วยแผ่นเมมเบรนที่มีเยื่อเลือกผ่าน ชีวแอโนดประกอบด้วยสารละลายเชื้อเพลิง (fuel) ที่มีเซลล์ของจุลินทรีย์ (microbial cell) หรือเอนไซม์ละลายอยู่ หรือถูกตรึงอยู่ที่ชีวไฟฟ้าแอโนด สารละลายเชื้อเพลิงที่ใช้ทั่วไปเช่น กลูโคส, เอทานอล, เมทานอล ฯลฯ จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ชีวแอโนด และอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิเจนนำไปใช้ในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันที่ชีวแคโทด⁶



รูปที่ 2.2 เป็นรูปทั่วไปของ biofuel cell⁷

การใช้เอนไซม์เป็นตัวคะตะลิสต์ หรือการใช้ biocatalyst ให้ข้อดีเหนือกว่าการใช้พวกโลหะทรานซิชันเป็นตัวคะตะลิสต์¹ คือ

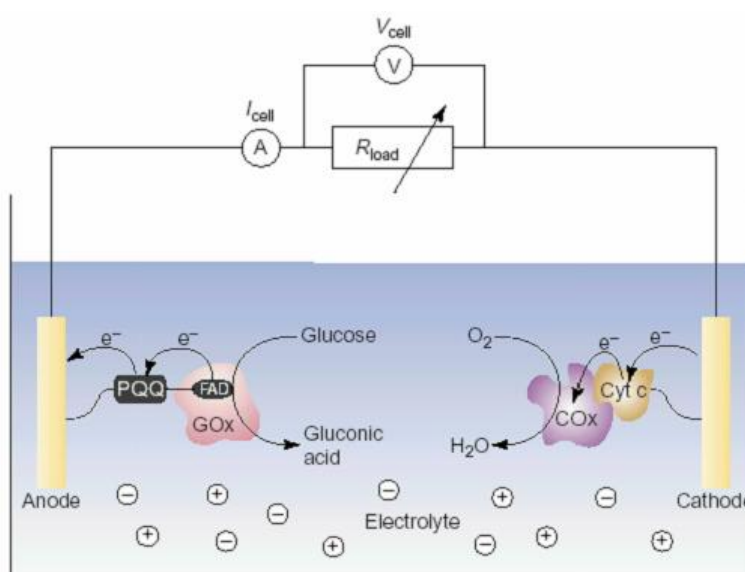
- 1) สภาวะในการใช้ไม่รุนแรง เช่น อุณหภูมิที่ใช้งานอยู่ที่ 20-40 °C ค่า pH ของสารละลายที่ใช้ใกล้เคียงกับ
- 2) ทำให้ราคาของเซลล์เชื้อเพลิงถูกลง

- 3) สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้
- 4) สามารถพัฒนาให้เป็นเซลล์เชื้อเพลิงที่ใช้เชื้อเพลิง (fuel) ชนิดต่างๆ ได้หลากหลาย

2.1 Enzyme-based biofuel cell

เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพเป็นแหล่งกำเนิดไฟฟ้ารูปแบบใหม่เพื่อทดแทนพลังงานที่มาจากถ่านหินหรือเชื้อเพลิงชนิดอื่น เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้เริ่มต้นจาก Galvani นักชีววิทยา ซึ่งค้นพบว่ากระแสไฟฟ้าสามารถเกิดขึ้นภายในสัตว์หลายชนิด เช่น กบ สามารถที่จะกระโดดได้เนื่องจากมีประจุไฟฟ้าภายในเซลล์กระดูกไขสันหลัง ปี ค.ศ. 1911 Potter² พบว่าเมื่อจุ่มขั้วไฟฟ้าแพลตินัม (Pt) ลงไปในสารละลายของเชื้อ E.Coli ทำให้เกิดศักย์ไฟฟ้าขึ้น จากนั้นปี ค.ศ. 1931 กลุ่มงานวิจัยของ Cohen ได้พัฒนาแบตเตอรี่เซลล์จากสารชีวภาพพบว่าสามารถให้ค่าความต่างศักย์ถึง 35 โวลต์⁸

ในทศวรรษที่ผ่านมา มีหลายกลุ่มงานวิจัยได้ทำการพัฒนาและปรับปรุงขั้วไฟฟ้าไบโอแอโนดและไบโอแคโทดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตอิเล็กตรอนและส่งผ่านอิเล็กตรอน ในปี ค.ศ. 1999 Katz และคณะ⁹ สร้างระบบเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพประกอบด้วย กลูโคสออกซิเดสที่พัฒนาด้วย PQQ-FAD และ glucose oxidase เอนไซม์ บน Cu^{2+} -poly(acrylic acid) film และขั้วแคโทดปรับปรุงโดยใช้ cytochrome C/cytochrome oxidase electrode บน Cu^{2+} -poly(acrylic acid) film องค์ประกอบของเซลล์แสดงดังรูปที่ 2.3 ระบบเซลล์เชื้อเพลิงนี้ทำให้เกิดกระแส $550 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ และสามารถให้กำลัง $21 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ มีอายุการใช้งาน 48 ชั่วโมง

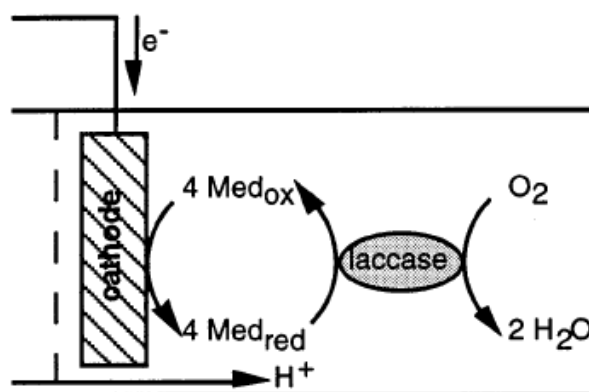


รูปที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีกลูโคสและออกซิเจนเป็นเชื้อเพลิงและออกซิแดนซ์ แสดงถึงการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก PQQ-FAD/GOx anode และ Cytochrom C/COx cathode⁹

2.2 Laccase-based biocathodes

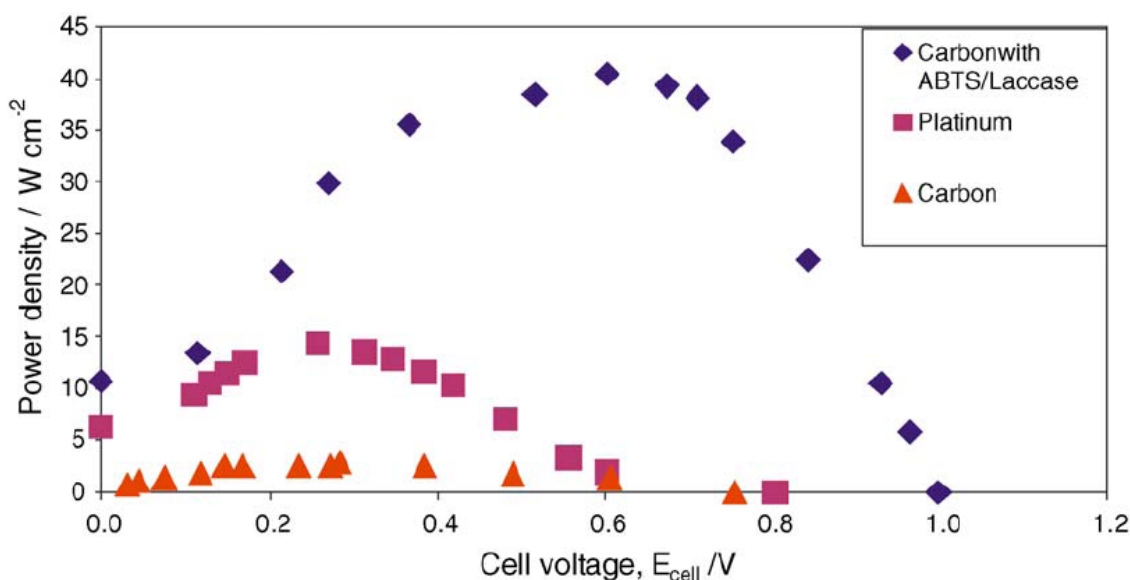
เอนไซม์หลายชนิดที่มี copper เป็นองค์ประกอบ เช่น ascorbate oxidase, laccase, ceruloplasmin สามารถใช้เป็นตัว catalyst ในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen (O_2) ไปเป็นน้ำ (H_2O) ได้ (ผ่านกระบวนการ four-electron reduction) laccase นับเป็นเอนไซม์ที่ใช้งานได้ง่ายที่สุดและน่าสนใจที่สุดในบรรดาเอนไซม์ทั้งหลายเหล่านี้ active site ของ laccase ประกอบด้วย copper ions 4 ตัว ($Cu(II/I)$) จากการตรวจวัดโดยใช้เทคนิค EPR)¹⁰ เอนไซม์ laccase ที่ถูกดูดซับบนพื้นผิวของอิเล็กโทรดชนิดต่าง ๆ เช่น ทอง (gold), pyrolytic graphite และ carbon black สามารถ catalyze ปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen ได้ ซึ่งในกรณีนี้อิเล็กโทรดทำหน้าที่เสมือน substrate สำหรับเอนไซม์ laccase^{11, 12} กระบวนการนี้เรียกว่า Direct electron transfer (DET) อย่างไรก็ตาม biocatalyst เหล่านี้ยังมีข้อด้อยในการนำไปพัฒนาเป็น biocathode ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ คือระดับของกระแสที่ให้ และความหนาแน่นของกระแส (current density) ของขั้วไฟฟ้าชนิดนี้มีค่าน้อย

คุณสมบัติอีกข้อหนึ่งของเอนไซม์ laccase คือการไม่เฉพาะเจาะจงต่อ substrate ทำให้เกิดข้อดีตามมา คือนอกจากกระบวนการ DET แล้ว laccase ยังสามารถ catalyze ปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen (O_2) ผ่านกระบวนการ Mediated electron transfer (MET) โดยในกระบวนการนี้เอนไซม์ laccase จะ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ substrate ชนิดต่าง ๆ เช่น mono-, di- หรือ polyphenols, arylamines หรือสารอินทรีย์บางชนิด เมื่อ laccase ไปออกซิไดส์สารเหล่านี้แล้ว จะสามารถทำให้ปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen เกิดขึ้นได้ดังแสดงในรูปที่ 2.4 Substrate ในกรณีนี้ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนจากขั้วแคโทดของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพไปยัง catalytic site ของ laccase เพื่อให้ dioxygen เกิด electro-enzymatic reduction อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นมักนิยมเรียก substrate ในกรณีนี้ว่า mediator



รูปที่ 2.4 การใช้ laccase เป็น biocathode ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดย laccase ทำให้ dioxygen (O_2) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ¹⁰

การพัฒนาประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยการพัฒนาขั้วแคโทดให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของ dioxygen มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเป็นอีกกระบวนการที่มีผู้วิจัยจำนวนมากให้ความสนใจ ในปี ค.ศ. 1999 Palmore และ Kim¹⁰ พัฒนาขั้วแคโทดโดยใช้เอนไซม์ laccase เป็น catalyst และใช้ 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) เป็น mediator รูปที่ 2.5 เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของขั้วแคโทดชนิดต่างๆ ของเซลล์เชื้อเพลิง ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าคาร์บอน, platinum และขั้วไฟฟ้าคาร์บอนที่โมดิฟายด์ด้วยเอนไซม์ laccase และ ABTS จากการศึกษพบว่าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนที่โมดิฟายด์ด้วยเอนไซม์ laccase และ ABTS ให้ประสิทธิภาพดี โดยสามารถให้ power density สูงถึง $42 \mu\text{W cm}^{-2}$ ที่ค่าความต่างศักย์ 0.61 V ($R = 1 \text{ k}\Omega$)



รูปที่ 2.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพขั้วแคโทดชนิดต่าง ๆ ของเซลล์เชื้อเพลิงในเทอมของการให้ power density กับค่าความต่างศักย์ของเซลล์¹

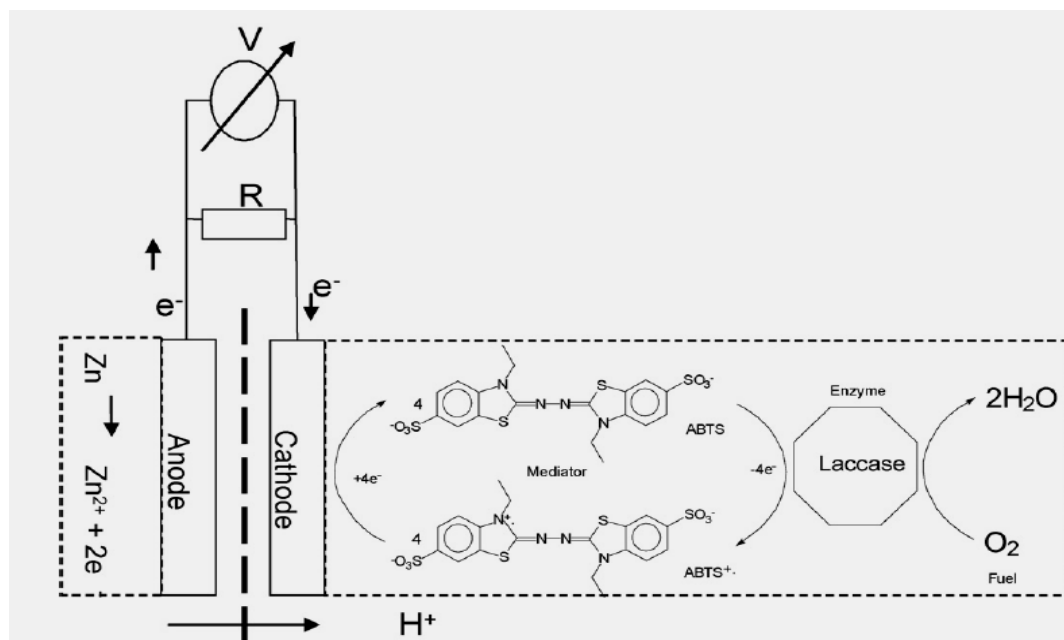
- Porous bioelectrode

ในปี ค.ศ. 2005 Farneth และคณะ¹³ พัฒนาขั้วไฟฟ้า biocathode โดยใช้พอร์รัสคาร์บอน (porous carbon) ซึ่งมีพื้นผิวสูงเป็นขั้วไฟฟ้าใช้เอนไซม์ laccase เป็น catalyst และใช้ ABTS เป็น mediator ข้อดีของการใช้พอร์รัสคาร์บอนซึ่งมีพื้นที่ผิวที่สูงคือจะทำให้กระแสที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนสูงขึ้น 3 - 4 เท่า ต่อมา Farneth และ D'More¹⁴ ได้พัฒนาประสิทธิภาพของ biocathode ชนิดนี้ให้ดีขึ้นโดยใช้กระบวนการ encapsulation เพื่อตรึงเอนไซม์ laccase โดยให้ทำปฏิกิริยากับ silica แล้วเอาใส่ไว้ในรูพรุนของพอร์รัสคาร์บอน ซึ่งกระบวนการ encapsulation นี้ทำให้ประสิทธิภาพของการเกิดรีดักชันของออกซิเจนสูงขึ้น และขั้ว biocathode ที่เตรียมขึ้นได้มีความคงตัวสูงซึ่งเป็นลักษณะที่ต้องการอีกประการหนึ่งในการนำไปใช้เป็นขั้วไฟฟ้าในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ

-Nano-structured biocatalyst

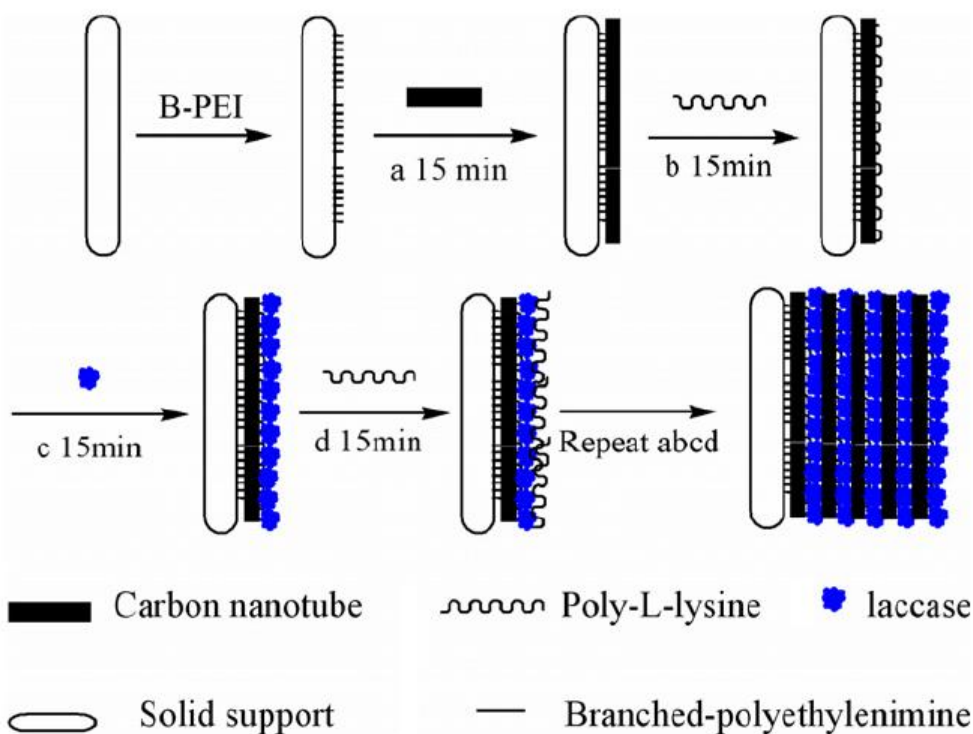
คาร์บอนนาโนทิวบ์ (carbon nanotube; CNT) คือคาร์บอนที่มีรูปร่างเป็นโครงตาข่าย ม้วนเชื่อมติดกันเป็นรูปทรงกระบอก และมีเส้นผ่าศูนย์กลางเพียงในระดับนาโนเมตร โครงสร้างของ CNT มีโครงสร้างเป็นแบบโมเลกุลเดี่ยว ที่มีลักษณะเป็นเกลียวของคาร์บอนเรียงตัวกันเป็นแนวยาวนับล้านๆ เท่าของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง โครงสร้างของ CNT จะโค้งตัวม้วนเป็นแกนจากด้านหนึ่งไปบรรจบอีกด้านหนึ่ง จากลักษณะการเรียงตัวของโมเลกุลดังกล่าวทำให้ CNT มีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก carbon-based materials อื่น ๆ เช่น glassy carbon (GC), highly oriented pyrolytic graphited (HOPG), fullerene และเพชร¹⁵ CNT มีลักษณะที่พิเศษคือ แข็งแรงและเหนียวกว่าเหล็กกล้า มีพื้นที่ผิวมาก ความยืดหยุ่นสูง โค้งงอได้ สามารถบรรจุอะตอม หรือโมเลกุลชนิดอื่นไว้ภายในท่อได้ นำไฟฟ้า หรือกลายเป็นฉนวนได้ ขึ้นอยู่กับทิศทางของแนวการจัดเรียงตัวของอะตอมคาร์บอนบนผนังคาร์บอนนาโนทิวบ์ นอกจากนี้ยังมีความแข็งแรงและมีน้ำหนักเบา⁵ ซึ่งคุณสมบัติที่พิเศษเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางทั้งในด้าน electrochemical sensors, protein electrochemistry, electrocatalysis และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านไบโอเซนเซอร์และเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ^{15, 16}

ในปี ค.ศ. 2008 Smolander และคณะ¹⁷ ทำการศึกษาเพื่อพัฒนา printable biocathode โดยใช้ผงหมึกพิมพ์ต่างๆ เช่น carbon-based ink หรือ silver-based ink ผสมกับ CNT ใช้ ABTS เป็น mediator และเอนไซม์ laccase จากนั้นพิมพ์ลงบนกระดาษกรองให้มีความหนาประมาณ $50\ \mu\text{m}$ biocathode ที่พัฒนาขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับขั้วแอโนดที่เป็น printed Zn layer ดังรูปที่ 2.6 พบว่าสามารถให้ค่าความต่างศักย์ของเซลล์ที่ 0.6 - 0.8 V เป็นเวลา 2-3 วันเมื่อโหลดความต้านทานที่ $2.2\ \text{k}\Omega$



รูปที่ 2.6 แผนภาพของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ประกอบด้วย laccase-printed biocathode และครึ่งเซลล์ของ Zn¹⁷

Deng และคณะ¹⁸ ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยพัฒนา ขั้วไบโอแคโทดแบบหลายชั้น (multilayer) ซึ่งเตรียมโดยนำ Indium-doped tin oxide (ITO) อิเล็กโทรดมา เคลือบด้วยฟิล์มของ poly-L-lysine ที่มี CNT และ เอนไซม์ laccase ผ่านกระบวนการ layer-by-layer-self-assembly

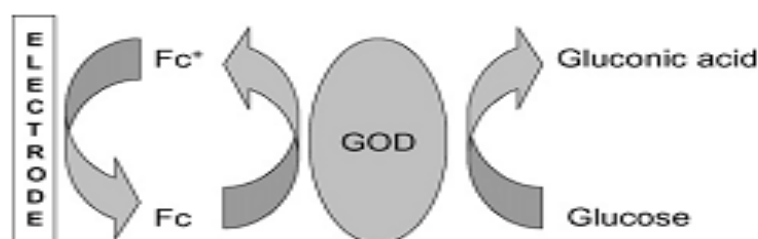


รูปที่ 2.7 แผนภาพกระบวนการเตรียมไบโอแคโทดแบบ layer-by-layer-self-assembly ของเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่พัฒนาขึ้นโดย Deng และคณะ¹⁸

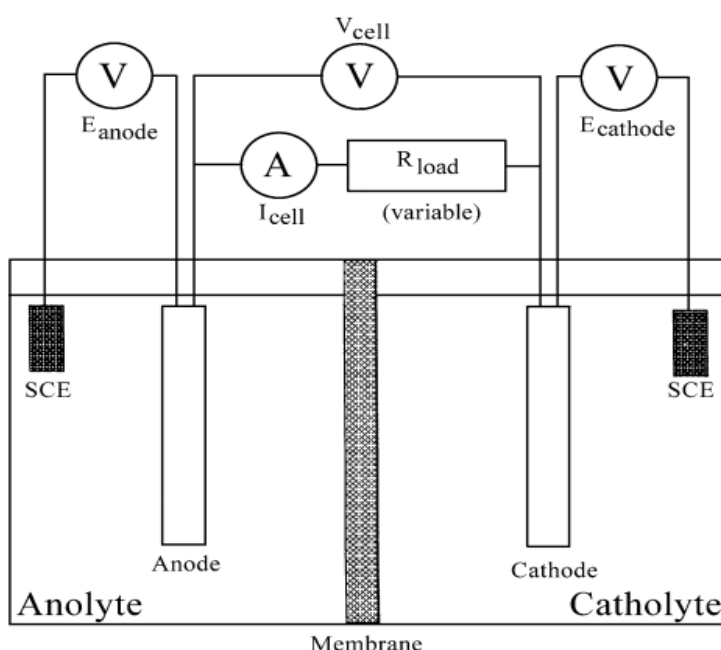
ในกระบวนการเตรียมแสดงดังแผนภาพในรูปที่ 2.7 ขั้นตอนแรกจะทำการเคลือบขั้วอิเล็กโทรด ITO (solid support) ซึ่งมีประจุเป็นลบด้วย branched-polyethylenimine (B-PEI) จากนั้นนำอิเล็กโทรดที่ได้ไปจุ่มในสารละลาย CNT และเอนไซม์ laccase ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าเมื่อนำขั้วไบโอแคโทดแบบหลายชั้น (multilayer) ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ร่วมกับครึ่งเซลล์ของ glucose ที่มีเอนไซม์ glucose dehydrogenase (GDH) เป็น catalyst และ NAD^+ เป็น cofactor พบว่าเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้สามารถให้ power density สูงถึง $329 \mu\text{W cm}^{-2}$ ที่ค่าความต่างศักย์ 0.47 V

2.3 Glucose oxidase-based bioanodes

ในปี ค.ศ. 2002 Pizzariello และคณะ¹⁹ พัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งประกอบด้วยขั้วแอโนดชนิดคาร์บอนที่ตรึงด้วยเอนไซม์ glucose oxidase และใช้ ferrocene เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอน กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันดังรูปที่ 2.8 ส่วนแคโทดมีลักษณะคล้ายกันแต่ใช้เอนไซม์แตกต่างคือใช้ horseradish peroxidase แผนภาพขององค์ประกอบเซลล์แสดงในรูปที่ 2.9 เซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้เมื่อให้ศักย์แก่ระบบ 0.22 โวลต์ พบว่าสามารถที่จะให้กำลังออกมา $0.15 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ เซลล์ที่ถูกพัฒนาขึ้นมานี้มีอายุการใช้งานได้ 30 วัน

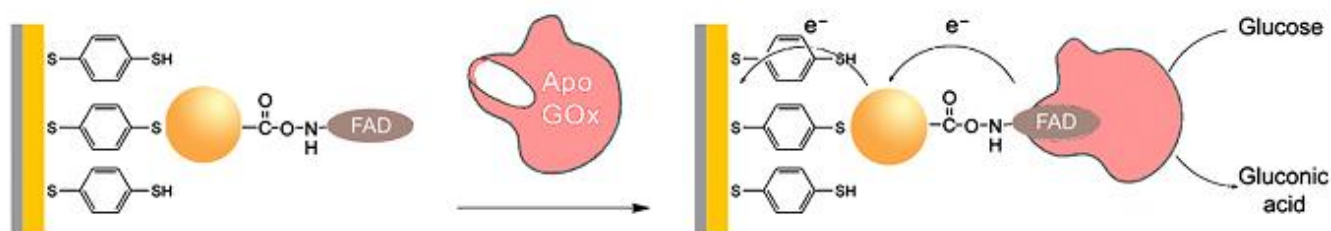


รูปที่ 2.8 แสดงการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยมี Ferrocene เป็นตัวนำส่งอิเล็กตรอน¹⁹



รูปที่ 2.9 แผนภาพแสดงองค์ประกอบของเซลล์เชื้อเพลิงโดยมีกลูโคสและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเชื้อเพลิงและออกซิแดนซ์ตามลำดับ ใช้ glucose oxidase และ horseradish peroxidase ตรึงบนขั้วไฟฟ้าแอโนดและแคโทดตามลำดับ¹⁹

ในปี ค.ศ. 2003 กลุ่มวิจัยของ Xiao²⁰ ได้พัฒนาขั้วไฟฟ้าที่มีการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเพื่อพัฒนาไปเป็นแอโนดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยใช้ Flavin adenine dinucleotide (FAD) เชื่อมต่อกับ semiconductor nanoparticle เป็นตัวนำส่งอิเล็กตรอนและมี dithio เป็นตัวเชื่อมระหว่างตัวนำส่งกับผิวหน้าอิเล็กโทรดที่ทำด้วยทองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งอิเล็กตรอนแสดงดังรูปที่ 2.10



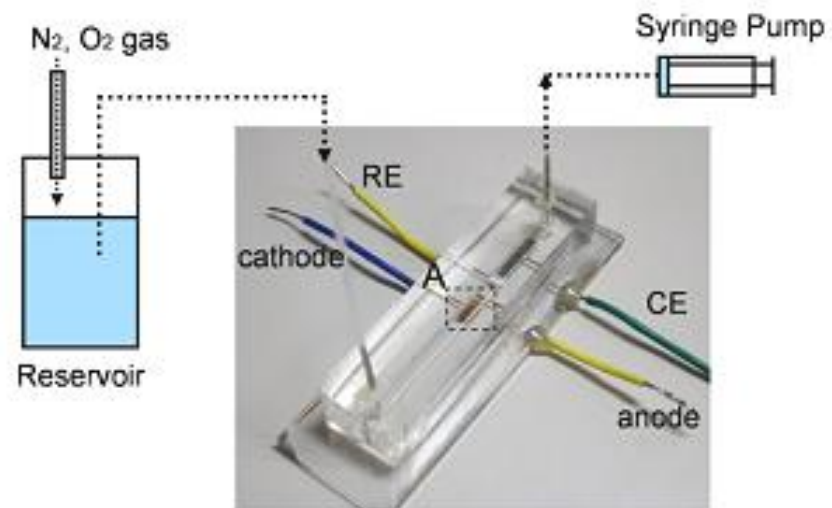
รูปที่ 2.10 แสดงโครงสร้างของ Au-semiconductor nanoparticle glucose oxidase electrode²⁰

ปี ค.ศ. 2006 Barriere และคณะ²¹ ได้ศึกษาเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่ประกอบด้วยแอโนดตรึงด้วยเอนไซม์ glucose oxidase และขั้วแคโทดตรึงด้วยเอนไซม์ laccase โดยใช้ osmium-based redox polymer เป็นสารนำส่งอิเล็กตรอนบนแกรไฟต์อิเล็กโทรด ศึกษาภายใต้อุณหภูมิ 37 °C เติร์มในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 4.4-7.4 พบว่าสามารถให้พลังงาน 10 - 40 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$

ในปี ค.ศ. 2006 Ivnitski และคณะ²² ได้พัฒนาขั้วไฟฟ้าแอโนดที่มีการตรึงเอนไซม์ glucose oxidase ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยตรึงเอนไซม์บน multi-wall carbon nanotube (MWCNT) ซึ่งจะช่วยให้การนำส่งอิเล็กตรอนโดยตรง ทำการทดลองภายใต้อุณหภูมิ 25 °C ในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 20 mM ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ 0.1 M KCl ให้ศักย์แก๊วแอโนด -0.38 และ -0.4 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl ผลทำให้เกิดการไหลของอิเล็กตรอนโดยตรงในระบบโดยไม่ต้องใช้ตัวนำส่งอิเล็กตรอน

ปี ค.ศ. 2007 Lui และ Dong^{23, 24} ได้พัฒนาขั้วไฟฟ้าสำหรับเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยการตรึงเอนไซม์ glucose oxidase และ laccase บน MWCNT เป็นแคตตาลิติกแอโนดและแคโทดตามลำดับ เซลล์เชื้อเพลิงที่พัฒนาขึ้นใช้ ferrocene mono carboxylic acid เป็นตัวนำส่งอิเล็กตรอน ของขั้วแอโนด จากผลการทดลองสามารถให้พลังงาน 4.1 μW

ในปี ค.ศ. 2008 Togo และคณะ²⁵ ศึกษาและพัฒนาระบบเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพให้มีขนาดไมโคร (micro fluidic biofuel cell) โดยระบบที่พัฒนาขึ้นประกอบด้วย กลูโคสแอโนดโดยตรึงเอนไซม์ glucose dehydrogenase, ไดอะฟอเรส (diaphorase) และ VK₃-pendent poly-L-lysine ส่วนขั้วแคโทดทำการตรึงเอนไซม์ bilirubin oxidase บนออกซิเจนแคโทด ดังรูปที่ 2.11 ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกระแสได้ ดีขึ้นกว่าเซลล์ปกติ 10 %



รูปที่ 2.11 microfluidic biofuel cell ²⁵

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ในการศึกษาวิจัยนี้ มีเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองไซคลิกโวลแทมเมทรีและแอมเพอร์โรเมทรี ดังตารางที่ 3.1 และ ระบบเอฟไอเอที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรี ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดไซคลิกโวลแทมเมทรีและแอมเพอร์โรเมทรี

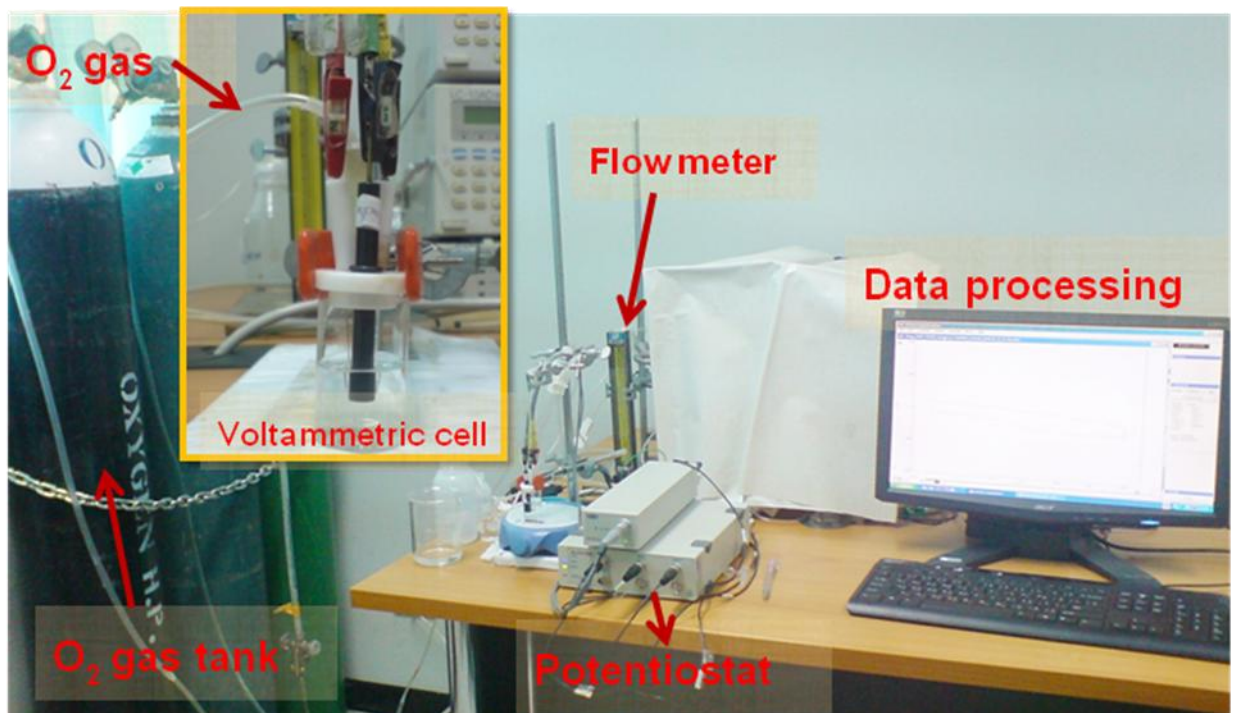
Instrument	Model	Company
Potentiostat, e-Corder	EA161, 210	eDAQ, Australia
Data System	e-Chem	
Working electrode	Glassy carbon electrode (3 mm)	CH Instruments, USA
Reference electrode	Ag/AgCl electrode (3 M KCl)	CH Instruments, USA
Auxiliary electrode	Pt wire	CH Instruments, USA
Thin layer flow cell	CHI 130	CH Instruments, USA
Flow meter	100624-103	Kofloc, Japan

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในระบบเอฟไอเอที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรี

Instrument	Model	Company
Injection	20 μ L injection loop	Rheodyne, USA.
Pump	LC-10AD	Shimadzu
Detector	EA161, 210	eDAQ, Australia
Data system	eDAQ-chart	eDAQ, Australia
Thin layer flow cell	CHI 130	CH Instruments, USA

Cyclic voltammetry and amperometry

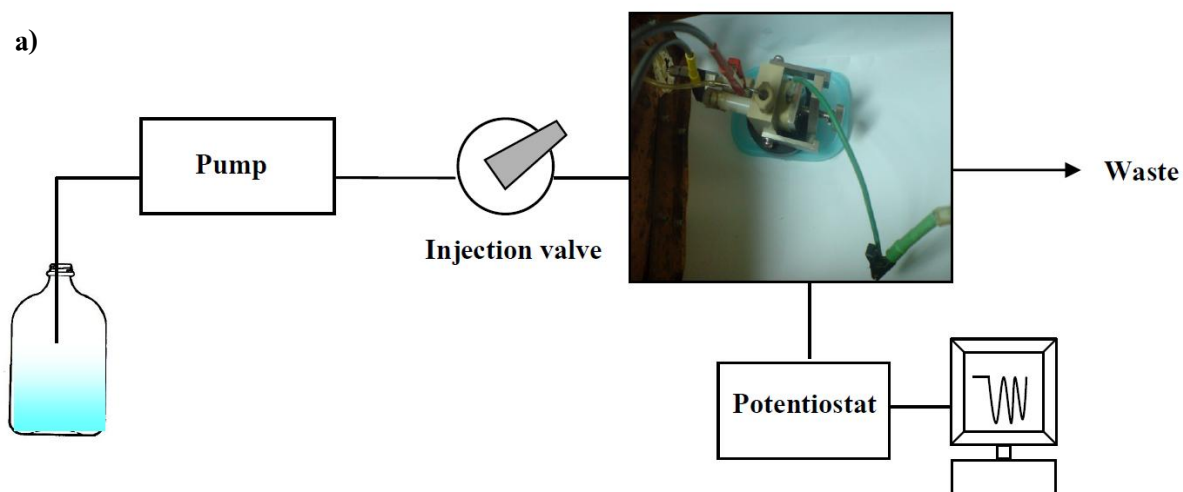
การทดลองไซคลิกโวลแทมและแอมเพอร์โรเมตรีแสดงดังรูปที่ 3.1 เครื่องโพเทนชิโอสเตท รุ่น EA 161 และ e-corder รุ่น 210 (บริษัท EDAQ) และ โวลแทมเมตริกเซลล์ ขนาด 25 mL (รูปแทรก, รูปที่ 3.1) ประกอบด้วย ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน(GC) ธรรมดา (3 mm diameter) หรือ ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่โมดิฟายด์ด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงและ ใช้ลวด Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย



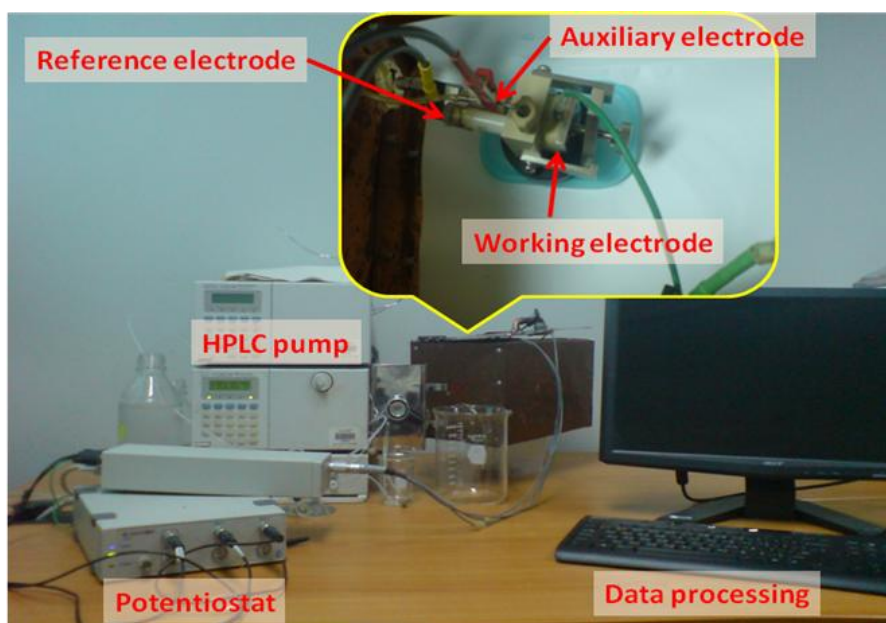
รูปที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองไซคลิกโวลแทมเมตริกและแอมเพอร์โรเมตรี รูปแทรกแสดงโวลแทมเมตริกเซลล์

Flow Injection system with amperometric detection

ระบบเอฟไอเอที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอโรเมทรีแสดงดังรูปที่ 3.2



b)



รูปที่ 3.2 (a) แผนผังของระบบเอฟไอเอที่มีตัวตรวจวัดแบบแอมเพอโรเมทรี (b) รูปเครื่องมือที่ใช้ที่ใช้ในการทดลอง

3.2 การพัฒนาข้าวไบโอแคโทดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ dioxygen (O_2) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ (H_2O) โดยใช้ nano-composite ของเอนไซม์ laccase

งานวิจัยในส่วนแรกนี้ได้พัฒนาเทคนิคในการตรึงเอนไซม์แลคเคสบนผิวหน้าของข้าวไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน โดยใช้คาร์บอนนาโนทิวบ์ ซึ่งเป็นสารที่มีพื้นที่ผิวสูงและสามารถจุสารต่างๆ ในท่อคาร์บอนนาโนทิวบ์ได้ เป็นตัวช่วยให้สามารถตรึงเอนไซม์แลคเคสได้ในปริมาณที่สูงขึ้น ในการพัฒนาข้าวไบโอแคโทดโดยใช้เอนไซม์แลคเคสในการตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน โดยจะใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีในการศึกษาทำการศึกษหาองค์ประกอบที่เหมาะสมของข้าวไบโอแคโทด และเลือกใช้สารละลาย 0.1 M ซีเทรตบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนูน ในการศึกษาไซคลิกโวลแทมโมแกรมของออกซิเจน

สารเคมี

เอนไซม์แลคเคส (Laccase, EC 1.10.3.2) จาก Tramestes Versicolor 22.4U/mg (Sigma-Aldrich) คาร์บอนนาโนทิวบ์ (Carbon nanotubes; CNT, บริสุทธิ์ 95%), (NanoLab), ไดเมทิลฟอร์มานไมน์ (DMF),(Fluka) ไคโตซาน (Chitosan; CS, medium molecular weight, 75-85% deacetylated) (Sigma-Aldrich), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin; BSA, non acetylated), (Sigma-Aldrich), ซีเทรตบัฟเฟอร์ เตรียมจากซิดิกแอซิดโมโนไฮเดรต และไดโซเดียมซีเทรต

การเตรียมสารเคมี

สารละลายแลคเคสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งเอนไซม์แลคเคส 4 มิลลิกรัมใส่ในขวดขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดสารละลาย 0.1 โมลาร์ ซีเทรตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด นำสารละลายไปเขย่าด้วย vertex mixer ประมาณ 5 นาที

สารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมินความเข้มข้น 1% เตรียมโดยปิดโบวีนซีรัมอัลบูมินมา 100 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำ

สารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยพัฒนาจากวิธีของ J. Wang และ M. Musameh²⁶ โดยชั่งคาร์บอนนาโนทิวบ์ 3.0 มิลลิกรัม ใส่ในขวดขนาด 5 มิลลิลิตร ปิดสารละลายไดเมทิลฟอร์มานไมน์ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% เตรียมโดยพัฒนาจากวิธีของ T. Tangkuaram และคณะ²⁷โดยชั่งไคโตซาน 0.10 กรัม ใส่ในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ปิดกรดอะซิติกความเข้มข้น 2% ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรใส่ในขวด นำไปกวนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สารละลายของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน เตรียมโดยปิดสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% มาอย่างละ 500 ไมโครลิตร ใส่ในขวดขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vertex mixer ประมาณ 5 นาที

ก่อนนำขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนไปตัดแปรรูปเป็นขั้วไฟฟ้าชนิดต่าง ๆ จะนำขั้วไฟฟ้ามาทำความสะอาด โดยขัดผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าด้วยผงอะลูมินากับผ้าสักหลาด โดยใช้ผงอะลูมินาขนาด 1.0, 0.3 และ 0.05 ไมครอนตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไป sonicate ในน้ำเป็นเวลา 2 นาที แล้วเป่าให้แห้ง

การเตรียมขั้วไฟฟ้า

ก่อนนำขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนไปตัดแปรรูปเป็นขั้วไฟฟ้าชนิดต่าง ๆ จะนำขั้วไฟฟ้ามาทำความสะอาด โดยขัดผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าด้วยผงอะลูมินากับผ้าสักหลาด โดยใช้ผงอะลูมินาขนาด 1.0, 0.3 และ 0.05 ไมครอนตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไป sonicate ในน้ำเป็นเวลา 2 นาที แล้วเป่าให้แห้ง

ขั้วไฟฟ้า GC/laccase

หยดสารละลายเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ขั้วไฟฟ้าขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ตัดแปรรูปด้วยเอนไซม์แลคเคส (GC/laccase)

ขั้วไฟฟ้า GC/CNT

หยดสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในแห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ขั้วไฟฟ้าขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ตัดแปรรูปด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT)

ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS

หยดสารละลายของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน บนขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในแห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ขั้วไฟฟ้าขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ตัดแปรรูปด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน (GC/CNT-CS)

การตรึงเอนไซม์แลคเคสและสารละลายโพรตีนซีรัมอัลบูมินบนขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS

นำขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS ที่ได้จากการเตรียมมาตรึงเอนไซม์โดยการหยดเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และหยดสารละลายโพรตีนซีรัมอัลบูมินความเข้มข้น 1% ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ตัดแปรรูปด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน เอนไซม์แลคเคส และโพรตีนซีรัมอัลบูมิน (GC/CNT-CS/laccase/BSA)

การตรวจวัดปริมาณออกซิเจน

ศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีโดยใช้เครื่อง โพอเทนชิโอสเตท และระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า ใช้ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC) หรือขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมา เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0.0 ถึง -0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ให้แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ในสารละลายของ ซีเทรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

การทดลองในสภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจน จะนำสารละลายซิเทรตบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่อิ่มตัวด้วยแก๊สอาร์กอน (Ar) มาทำการวัดด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรีภายใต้บรรยากาศแก๊สอาร์กอน ส่วนในสภาวะที่มีออกซิเจนจะนำสารละลายซิเทรตบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อิ่มตัวด้วยแก๊สออกซิเจน มาทำการทดลองภายใต้อัตราการไหลของออกซิเจน 40 มิลลิลิตรต่อนาที

3.3 การพัฒนาชีวไบโอเอนโดชนิดใหม่ในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการ catalyze ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส

3.3.1 การพัฒนาชีวไบโอเอนโดโดยใช้โพลิเมอร์ชนิด polyaniline (co-m-ferrocenylaniline) ในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

งานวิจัยในส่วนนี้ได้พัฒนาโกลโคสไบโอเซนเซอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง และมีสภาพไวสูงโดยการโม่ติฟายด์ชีวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนด้วยโพลิเมอร์นำไฟฟ้าชนิด polyaniline (co-m-ferrocenylaniline) และไคโตซานซึ่งเป็นไบโอโพลิเมอร์ธรรมชาติมาช่วยในการทำให้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสมีความคงตัวมากขึ้น เพื่อพัฒนาเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณของกลูโคส

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการโม่ติฟายด์ชีวไฟฟ้า

สารละลาย ไคโตซาน ความเข้มข้น 0.5% เตรียมโดย ชั่งไคโตซานมา 0.0500 g ละลายด้วยสารละลาย acetic acid ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 10 mL นำไปกวนเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จะได้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.5%

สารละลายโพลิเมอร์ poly (aniline-co-m-ferrocenylaniline) ความเข้มข้น 2.5 mg/mL เตรียมโดย ชั่ง poly (aniline-co-m-ferrocenylaniline) หรือ PFCANi มา 0.0050 g ละลายใน tetrahydrofuran (THF) 2 mL นำไป sonicate เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

สารละลายกลูโคสออกซิเดส ความเข้มข้น 2 mg/mL เตรียมโดยชั่งกลูโคสออกซิเดสมา 0.0020 g ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 1 mL (เก็บไว้ในตู้เย็น)

สารละลาย Sodium Citrate ความเข้มข้น 1% เตรียมโดย ชั่ง sodium citrate มา 0.1000 g ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาณเล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 mL ด้วยน้ำ DI

สารละลายอนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) ความเข้มข้น 0.01% เตรียมโดย ปิเปตสารละลาย HAuCl_4 มา 10 μL เจือจางด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 mL ด้วยน้ำ DI จากนั้นปิเปต สารละลาย HAuCl_4 มาปริมาตร 5 mL นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที พร้อมกวนตลอดเวลา จากนั้นเติมสารละลาย Sodium Citrate ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 170 μL ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125°C พร้อมกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 30 นาที จะได้ AuNPs ความเข้มข้น 10 mM

สารละลายมาตรฐานกลูโคส (glucose standard solution) ความเข้มข้น 0.2 M เตรียมโดยชั่งกลูโคส มา 1.8000 g ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาณเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลาย

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ให้ครบ 50 mL จะได้สารละลายมาตรฐานกลูโคส (glucose standard solution) ความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 50 mL ซึ่งใช้เป็น stock solution ในการเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ

การเตรียมขั้วไฟฟ้าไบโอแอโนดชนิดต่างๆ โดยใช้โพลิเมอร์ ชนิด polyaniline (co-m-ferrocenylaniline)

GC/PFcAni

เตรียมโดยหยดสารละลาย PFCAni ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอน 40 ไมโครลิตรไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนที่โมดิฟายด้วยสารละลาย polyaniline (co-m-ferrocenylaniline) หรือ GC/PFcAni

GC/PFcAni/GOx

นำขั้วไฟฟ้า GC/PFcAni ที่ได้จากการเตรียมมาตรึงเอนไซม์โดยการหยดเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนที่โมดิฟายด้วยสารละลาย PFCAni และ กลูโคสออกซิเดส (GC/PFcAni/GOx)

GC/CS/PFcAni

หยดสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.5% บนขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอน 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยดสารละลาย PFCAni ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนขั้วไฟฟ้า 40 ไมโครลิตรไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ขั้วไฟฟ้า GC/CS/PFcAni

GC/CS/PFcAni/GOx

นำขั้วไฟฟ้า GC/CS/PFcAni มาตรึงเอนไซม์โดยการหยดเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนที่โมดิฟายด้วยสารละลาย CS, PFCAni และ กลูโคสออกซิเดส (GC/PFcAni/GOx)

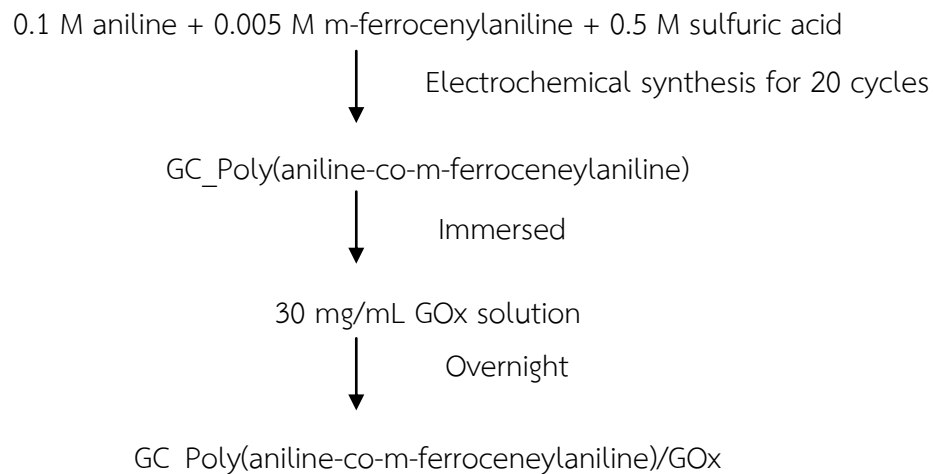
GC/CS/PFcAni/AuNPs/GOx

นำขั้วไฟฟ้า GC/CS/PFcAni มาหยดสารละลายอนุภาคทองคำนาโน ปริมาตร 40 ไมโครลิตรไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาตรึงเอนไซม์โดยการหยดเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ขั้วไฟฟ้ากาสีคาร์บอนที่โมดิฟายด้วยสารละลาย CS, PFCAni, AuNPs และ กลูโคสออกซิเดส (GC/PFcAni/AuNPs/GOx)

การสังเคราะห์ poly(aniline-co-m-ferroceneylaniline) ด้วยวิธีการทางไฟฟ้า

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาและพัฒนาขั้วไฟฟ้าโดยใช้โพลิเมอร์ในกลุ่มโพลีอนิลินที่มีหมู่เฟอร์ซีนเป็นหมู่แทนที่บนวงเบนซีนด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางไฟฟ้า (electrochemical synthesis) เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการ

นำมาช่วยตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยการสแกนค่าศักย์ไฟฟ้าจาก -0.3 ถึง 0.9 โวลต์ จำนวน 10 รอบ รายละเอียดแสดงดัง Flow diagram



เรียกขั้วไฟฟ้าที่เตรียมได้นี้ว่า GC_poly(Ani-co-m-FcAni) จากนั้นนำไปตรึงเอนไซม์ GOx โดยการแช่ขั้วไฟฟ้าในสารละลาย 30 mg/mL GOx เป็นเวลา 1 คืน ก่อนนำไปวิเคราะห์กลูโคส

3.3.2 การพัฒนาขั้วไบโอแอโนดโดยใช้นาโนคอมโพสิตของคาร์บอนนาโนทิวบ์ และไคโตซานในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

สารเคมี

ไคโตซาน (Chitosan; CS, medium molecular weight)(Sigma), คาร์บอนนาโนทิว (Carbon nanotube : MWCNT, บริสุทธิ์ 95%), (Nanolabinc., MA, USA), เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) เฟอร์โรซีนคาร์บอกซัลดีไฮด์ (Ferrocenecarboxaldehyde; FcCHO, AR เกรด)(Sigma), ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เตรียมจากไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (pH 7.0, 0.1M)

การเตรียมสารเคมี

สารละลาย ไคโตซาน ความเข้มข้น 0.5 % (0.5 % chitosan) เตรียมโดย ชั่งไคโตซาน มา 0.0500 g ละลายด้วยสารละลาย กรดอะซิติก ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 10 mL จากนั้นกวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้สารละลายไคโตซานที่มีลักษณะ ชื่น ใส ไม่มีสี

การเตรียม MWCNT-FcCHO และ MWCNT-NH₂-FcCHO ชั่ง MWCNT มา 15 mg แล้วเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 mL นำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น เติม FcCHO ความเข้มข้น 7 mg/mL ปริมาตร 10 mL นำไป stirred ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาทีอีกครั้ง หลังจากนั้นนำไป centrifuge 15 นาทีตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน ล้างด้วยเมทานอล 10 mL และล้างด้วยน้ำ DI 10 mL นำตะกอน MWCNT ที่ได้ไปอบให้แห้งการเตรียม MWCNT-NH₂-FcCHO ก็สามารถเตรียมได้ในทำนองเดียวกัน โดยใช้ MWCNT-NH₂ แทน MWCNT

การเตรียม MWCNT-FcCHO-NaCNBH₃ และ MWCNT-NH₂-FcCHO-NaCNBH₃ โดยซัง MWCNT มา 15 mg แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 mL นำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น เติม 7 mg/mL FcCHO ปริมาตร 10 mL นำไป stirred ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วเติม NaCNBH₃ 200 mg นำไป stirred ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาทีอีกครั้งหลังจากนั้นนำไป centrifuge 15 นาทีตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน ล้างด้วย เมทานอล 10 mL และล้างด้วยน้ำ DI 10 mL นำผงที่ได้ไปอบให้แห้ง จะได้ MWCNT-FcCHO-NaCNBH₃ การเตรียม MWCNT-NH₂-FcCHO-NaCNBH₃ ก็สามารถเตรียมได้ในทำนองเดียวกัน

สารละลายผสม MWCNT-CS เตรียมโดยซังคาร์บอนนาโนทิวบ์ (MWCNT) มา 4 mg เติมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.5 % ปริมาตร 1 mL แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที คาร์บอนนาโนทิวบ์ชนิดอื่นสามารถทำการเตรียมได้ทำนองเดียวกัน

สารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยซังคาร์บอนนาโนทิวบ์ (MWCNT) มา 4 mg ลงในขวด เติม DMF ปริมาตร 1 mL นำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที คาร์บอนนาโนทิวบ์ชนิดอื่นสามารถทำการเตรียมได้ทำนองเดียวกัน

สารละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยซังเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส มา 2 mg ละลายในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 mL สารละลายเฟอร์โรซีนคาร์บอกซิลเลตไฮดริด์ (FcCHO) สามารถเตรียมได้โดย ซัง FcCHO 0.2140 ± 0.0005 g ละลายด้วยเมทานอล 10 mL เติลงในขวดวัดปริมาตร 50 mL ปรับปริมาตรให้ครบด้วยเมทานอลจะได้สารละลาย FcCHO ความเข้มข้น 20 mM ซึ่งใช้เป็น stock solution

การตรึง FcCHO ในคาร์บอนนาโนทิวบ์โดยใช้การดูดซับทางกายภาพร่วมกับวิธีการทางเคมี เตรียม MWCNT-FcCHO โดยซัง MWCNT มา 15 mg แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 mL นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonicate เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น เติม 7mg/mL FcCHO ปริมาตร 10 mL นำไป stirr ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วเติม NaCNBH₃ 200 mg นำไป stirred ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonicate เป็นเวลา 30 นาทีอีกครั้งหลังจากนั้นนำไป centrifuge 15 นาทีตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแล้วดูดส่วนที่ใสทิ้ง นำสารที่เตรียมได้ล้างด้วย เมทานอล 10 mL สองครั้ง และล้างด้วยน้ำ DI 10 mL สองครั้ง นำผงที่ได้ไปอบให้แห้งเราจะได้ผงที่เรียกว่า MWCNT-FcCHO

การเตรียมขั้วไฟฟ้า

ก่อนที่จะนำขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนไปดัดแปลงไปเป็นขั้วไฟฟ้าชนิดต่างๆ ต้องนำขั้วไฟฟ้ามาทำความสะอาดโดยขัดผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าด้วยผงอะลูมินากับผ้าสักหลาดโดยใช้ผงอะลูมินาขนาด 1.0, 0.3, และ 0.05 ไมครอนตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไป sonicate กับน้ำปราศจากไอออน 5 นาที แล้วเป่าให้แห้ง

ขั้วไฟฟ้า GC/GOx

หยดสารละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรบนขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GC/GOx)

ชีวไฟฟ้า GC/CS

หยาตสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.5% ปริมาตร 40 ไมโครลิตรบนชีวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ที่งไว้ให้แห่งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ชีวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยไคโตซาน (GC/CS)

ชีวไฟฟ้า GC/MWCNT

หยาตสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรบนชีวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ที่งไว้ให้แห่งที่อุณหภูมิห้องจะได้ชีวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/MWCNT)

ชีวไฟฟ้า GC/MWCNT-CS

หยาตสารละลาย MWCNT-CS ปริมาตร 40 ไมโครลิตรบนชีวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ที่งไว้ให้แห่งที่อุณหภูมิห้องจะได้ชีวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปลงด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GC/MWCNT-CS)

ชีวไฟฟ้าGC/MWCNT-CS-GOx

นำสารละลาย MWCNT-CS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและสารละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาผสมกันในช่วงให้เข้ากันด้วย vertex mixer เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายผสม MWCNT-CS-GOx

นำสารละลาย MWCNT-CS-GOx 40 ไมโครลิตรไมโครลิตรบนชีวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ที่งไว้ให้แห่งที่อุณหภูมิห้องจะได้ชีวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ไคโตซานและเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GC/MWCNT-CS-GOx)

การตรวจวัดปริมาณกลูโคส

ศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (cyclic voltammetry ; CV) โดยใช้เครื่องโพเทนชิโอสเตท และระบบ 3 ชั่วไฟฟ้า ใช้ชีวไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC) หรือชีวไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น เป็นชีวไฟฟ้าทำงาน โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง +0.15 ถึง +0.50 V เทียบกับชีวไฟฟ้าอ้างอิง ให้ชีวไฟฟ้าทำงานในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีเฟอร์โรซีนคาร์บอกซัลดีไฮด์ (FcCHO) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเมดิเอเตอร์ ทั้งหมดทำทำภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (ภายใต้บรรยากาศก๊าซอาร์กอน)

