รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตกระแสไฟฟ้าของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพที่เลี้ยงเชื้อราขาวในขั้วคาโทดและจุลินทรีย์อีเอ็มชนิดสารเร่ง พด. 2 ของประเทศไทยในขั้วอาโนด

โดย

ดร.ณัฐต์ณิชา สุขเกษม

กรกฎาคม 2563

สัญญาเลขที่ TRG5780228

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตกระแสไฟฟ้าของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพที่เลี้ยงเชื้อราขาวในขั้วคาโทด และจุลินทรีย์อีเอ็มชนิดสารเร่ง พด. 2 ของประเทศไทยในขั้วอาโนด

ผู้วิจัย **สังกัด**

ดร.ณัฐต์ณิชา สุขเกษม **มหาวิทยาลัยแม่โจ้**

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ มหาวิทยาลัยต้นสังกัดแม่โจ้

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัยสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

เนื้อหา

บทคัดย่อ 4

Abstract 5

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา 6

2. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง 8

3. วัตถุประสงค์ 15

4. วิธีทดลอง 16

4.1 อิทธิพลของชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบและความชื้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ 16

4.2 การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อการเจริญของราขาว 18

4.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเจริญของเชื้อราขาว 18

4.4 การผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 20

4.5 เทคนิคการวิเคราะห์ 22

5. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 24

5.1 อิทธิพลของชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบและความชื้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ 24

5.2 ผลประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 35

6. สรุปผลการทดลอง 42

เอกสารอ้างอิง 43

สารบัญรูป

รูปที่ 1 หลักการพื้นฐานของระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 9
รูปที่ 2 A. เห็ดขอนขาว และ B. เห็ดนางรมภูฐาน 17
รูปที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ Lignin peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 27
รูปที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ Lignin peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อ เห็ดนางรมภูฐาน (PP),อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 28
รูปที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 29
รูปที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0 (R1K0), 1:1 (R1K1) และ 0:1(R0K1) 30
รูปที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ Laccase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 31
รูปที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ Laccase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1 32
รูปที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM), ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 33
รูปที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 34
รูปที่ 11 การเจริญของจุลินทรีย์ในถังแอโนดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 36
รูปที่ 12 ค่าการเปลี่ยนแปลง Voltage density และ Current density ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 37
รูปที่ 13 ค่าการเปลี่ยนแปลง Power Density ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 38
รูปที่ 14 การเจริญของจุลินทรีย์ในถังแอโนดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพในระบบ Biocathode 39
รูปที่ 15 ค่าการเปลี่ยนแปลง Voltage และ Power Density ในเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode 40
รูปที่ 16 ค่าการเปลี่ยนแปลง Current Density ในเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode 41

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของวัสดุทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ 7
ตารางที่ 2 สับเสรตและชนิดจุลินทรีย์ที่แตกต่างที่ใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าจากเซลล์ 14
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidase, Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ที่ผลิตขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ด ที่ระยะเวลาการเจริญ 42 วัน..... 26

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: สัญญาเลขที่ TRG5780228

ชื่อโครงการ: การผลิตกระแสไฟฟ้าของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพที่เลี้ยงเชื้อราขาวในขั้วคาโทด และจุลินทรีย์อีเอ็มชนิดสารเร่ง พด. 2 ของประเทศไทยในขั้วอาโนด

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ดร.ณัฐต์ณิชา สุขเกษม

วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

อีเมล์: jewy.ja@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: ระยะเวลา 2 ปี (2557 – 2559)

บทคัดย่อ:

นวตกรรมเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อประเมินความเป็นไปได้ของการผลิตกระแสไฟฟ้าควบคู่กับการเจริญของราขาวและจุลินทรีย์ปุ๋ยน้ำชีวภาพของประเทศไทยในการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราขาว บ่งชี้ว่า การเจริญของราขาวจากเห็ดนางรมภูฐานบนวัสดุเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมระหว่างฟางข้าวและแกลบที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่ค่าความชื้นของวัสดุเพาะเลี้ยงระหว่าง 70 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase, laccase, lignin peroxidase และ catalase สูงสุดที่ 0.055, 0.055, 0.059 และ0.052 U/ml ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้มีค่าสูงกว่าที่ได้จากราขาวของเห็ดขอนขาว ทั้งนี้ สารเมตาบอไลท์ที่เกิดขึ้นระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เหล่าในการเจริญของราขาวจะทำหน้าที่ในการเป็นสารให้ประจุบวกหรือโปรตรอนอื่น ๆ ที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพแบบเอซ ด้วยระบบจุลชีววิทยาของขั้วแคโทดโดยมีจุลินทรีย์ปุ๋ยน้ำชีวภาพได้ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำจำนวน 4 ครั้งเป็นระยะเวลา 65 วัน ภายในถังแอโนดในสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งการเจริญของจุลินทรีย์ปุ๋ยน้ำชีวภาพนี้จะทำหน้าที่ในการผลิตอิเล็กตรอน ระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพนี้ ให้ค่าความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า ค่าความหนาแน่นความต่างศักย์ และค่าประสิทธิภาพกำลังไฟฟ้าที่ 327 μAmp/cm^2, 32.77 mV/cm^2 และ 29.55 μW/cm^2 ตามลำดับ

คำหลัก : จุลินทรีย์ปุ๋ยน้ำชีวภาพ ราขาว จุลชีววิทยาขั้วแคโทด เซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

Abstract

Project Code: TRG5780228

Project Title: Electricity production using microbial fuel cell system culturing white fungi in cathode and EM microorganism PD2 of Thailand under anode

Investigator: Dr.Natthanicha Sukasem . School of Renewable Energy, Maejo University, Chiang Mai

E-mail Address: jewy.ja@gmail.com

Project Period: 2 years (2014 – 2016)

Abstract:

Microbial fuel cell Innovation was applied for evaluation on electricity production couple the growths of white fungi and Thailand biofertilizer microorganism. In the isolation of optimized conditions for the growth of white fungi, it was indicated that the culturation of white rod fungi from *Pleurotus pulmonarius* fungi on mixtures of culture material between rice straw and rice husk at ratio 1:1 at humidity in range between 70 to 75% showed the highest enzyme activities of manganese peroxidase, laccase, lignin peroxidase and catalase at 0.055, 0.055, 0.059 and 0.052 U/ml, respectively. Moreover, these enzyme activities were higher than the activities from *Lentinus squarrosulas* Mont fungi. Therefore, the metabolite chemicals occurred during these enzyme activities for growth of white fungi were acted as donors for positive charge chemicals or other protons that increased the efficiency of electricity production by microbiol fuel cell system type H by using biological cathode. During this step, the biofertilizer microorganism was cultured by using repeated batch system for 4 times within 65 days under anaerobic condition. These microbial growths generated the electron. This microbial fuel cell system showed the current density, voltage density, and power density at values of 327 μAmp/cm^2, 32.77 mV/cm^2 and 29.55 μW/cm^2, respectively.

Keywords: Biofertilizer microorganism White fungi Biological cathode Microbial fuel cell

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

กระบวนการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลเชื้อเพลิงจุลชีพด้วยระบบ Biological cathode กำลังได้รับการศึกษาวิจัยเพิ่มสูงขึ้น เพื่อค้นหาและศึกษาประสิทธิภาพของสารชีวภาพที่สามารถนำมาใช้เป็นสารรับอิเล็กตรอน เช่น เอนไซม์กลุ่ม lignocelluloses เอนไซม์ laccase ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย หรือ รา เช่น ในงานวิจัยของ Gelo-Pujic *et al*., 1999 ที่ศึกษาการใช้เอนไซม์ laccase ที่ผลิตจาก *Pichia pastoris* เพื่อวิเคราะห์ระบบ Electrochemical ในการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพแบบ Biological cathode MFU เป็นต้น

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ 4 ชนิด คือ เอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidas, Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ที่ผลิตขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงราขาว 2 ชนิด ได้แก่ เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulas* Mont.) และเห็ดนางรมภูฐาน (*Pleurotus pulmonarius*) ซึ่งเป็นเห็ดที่ชอบอากาศร้อนชื้น เพาะเลี้ยงได้ง่าย และเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมในการบริโภค โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงราขาว ได้แก่ แกลบ และฟางข้าว ที่เป็นวัสดุทางการเกษตร และถูกนำมาศึกษาเพื่อทดแทนหรือเป็นวัสดุเสริมในผลิตก้อนเชื้อเห็ดต่างๆ รวมทั้งเห็ดขอนขาวและเห็ดรางรมภูฐาน ร่วมกับวัสดุหลัก คือ ขี้เลื่อยไม้ยางพารา โดยมุ่งให้เกิดการลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากในปัจจุบัน ขี้เลื่อยไม้ยางพารามีความต้องการในธุรกิจการเพาะเลี้ยงเห็ดเชิงเศรษฐกิจในปริมาณค่อนข้างสูง และมีราคาแพง ในระหว่างการเจริญของราขาวโดยใช้แกลบ และฟางข้าว หรือแม้กระทั่งวัสดุทางการเกษตรอื่นๆ จะเกิดกระบวนการย่อยสลายสารองค์ประกอบกลุ่ม Lignocelluloses โดยเอนไซม์กลุ่ม ligninolytic enzymes หลายชนิดทำงานร่วมกันในการย่อยสลายสารองค์ประกอบในแกลบและฟางข้าว เช่น Cellulose, hemicelluloses และ lignin เป็นต้น ซึ่งปริมาณสารองค์ประกอบได้มีรายงานวิจัยศึกษาและวิเคราะห์ปริมาณสารองค์ประกอบในวัสดุทางการเกษตรต่างๆ ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของวัสดุทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ

Agricultural	Cellulose	Hemicelluloses	Lignin	Others
Bagasse	44	23	20	13
Corncon	34.1	42.5	12.8	10.6
Peanut shell	22.1	12.1	35.2	30.6
Rice hull	49.1	9.6	12.9	28.4
Rice straw	33	26	7	34
Sugarcane leaf and stalk	40	29	13	18
Sorghum leaf and stalk	31	30	11	28

การวิเคราะห์การผลิตและกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidas, Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ด ณ สภาวะที่ศึกษาต่างๆ กัน จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพแบบ Biological Cathode หรือ Biocathode ร่วมกับการผลิตจุลินทรีย์ พด. 2 ในถังแอโนด

2. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

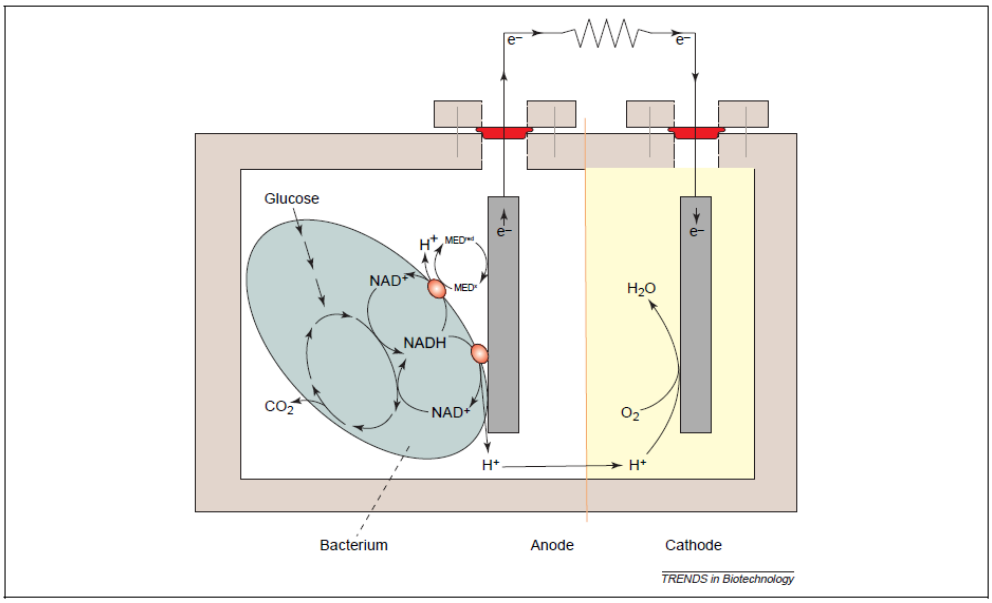
2.1 หลักการพื้นฐานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

เทคโนโลยีเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ เป็นนวัตกรรมเทคโนโลยีใหม่ในการผลิตกระแสไฟฟ้าจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่มีการส่งผ่านของอิเล็กตรอนภายนอกเซลสู่สภาวะแวดล้อม ซึ่งกลไกนี้จะแตกต่างกับเซลล์เชื้อเพลิงหรือแบตเตอร์รี่ในอดีต ด้วยการเปลี่ยนพลังงานเคมีจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ให้เป็นพลังงานไฟฟ้า (Cao Xiaoxin; และคนอื่น ๆ. 2008:) ด้วยปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี (รูปที่ 1) ทั้งนี้ กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพจะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

กระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ไปยังขั้วแอโนด มี 2 กระบวนการ คือ

(1) การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนทางอ้อม (indirect transfer system) ซึ่งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนนี้อาศัยสารตัวกลางที่เรียกว่าสารสื่อนำอิเล็กตรอน (electron mediators หรือ shuttles) สารสื่อนำอิเล็กตรอนนี้ควรมีค่า potential ที่เท่ากับหรือต่ำกว่า -300mV (Rabaey Korneel; และVerstraete Willy. 2005). สารสื่อนำอิเล็กตรอนที่นิยมใช้ได้แก่ methylene blue, neutral red (Davila D.; และคนอื่น ๆ 2008), quinines, cytochromes, flavin mononucleotide และ (ribo) flavin (Von Canstein H.; และคนอื่น ๆ 2008)

(2) การเคลื่อนย้านอิเล็กตรอนโดยตรง (Direct electron transfer) ซึ่งการส่งผ่านอิเล็กตรอนจะเกิดที่ผิวหน้าของเซลล์จุลินทรีย์ (Cell surface) ผ่านระบบช่องส่งผ่านอิเล็กตรอน (Electronic nanowire) (Scott K.; และคนอื่น ๆ 2007:)



รูปที่ 1 หลักการพื้นฐานของระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

นอกจากนี้โปรตอนในระบบถังแอโนดจะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเมมเบรนคัดเลือกไปยังถังคาโทด ซึ่งในระบบถังคาโทด อิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่จากระบบถังแอโนดมาสู่ถังคาโทด จะรวมตัวกับโปรตอนและออกซิเจนในระบบถังแคโทดจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์ สารออกซิไดเซอร์เช่น ferricyanide or Mn(IV) สามารถที่จะถูกนำมาใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนที่ออกซิเจนได้ (Brucee Logan; และคนอื่น ๆ. 2006:) ในขณะเดียวกันนี้ขั้วแอโนดและขั้วคาโทดซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยสายไฟ ทำให้ระบบการผลิตไฟฟ้าเกิดขึ้นครบวงจรจากความต่างศักย์ที่แตกต่างกันระหว่างระบบถังแอโนดและถังคาโทด

2.2 ปัจจัยที่มีต่อประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ ได้แก่

(1) อัตราการเปลี่ยนสับเสตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ (Substrate conversion rate) ขึ้นกับจำนวนของจุลินทรีย์ การผสมและการเคลื่อนย้านสารอาหาร(Mass transfer)ในระบบถังผลิต จลนพลศาสตร์การเจริญของจุลินทรีย์ (microbial kinetics) อัตราการให้สารอาหาร (g substrate per g biomass present per day), และประสิทธิภาพของการแลกเปลี่ยนประจุของ

เยื่อเมมเบรนเลือกผ่านของประจุบวก (proton exchange membrane) และความต่างศักย์รวมของระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

(2) ค่า Overpotential ของขั้วแอโนด ขึ้นกับพื้นที่ผิวหน้าของขั้วแอโนด คุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมีของขั้วอิเล็คโทรด ความต่างศักย์ของขั้วอิเล็คโทรด กลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอนของสารสื่อนำอิเล็กตรอน (Mediator) และค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

คุณสมบัติที่ดีของสารสื่อนำอิเล็กตรอน ประกอบด้วย (1) สามารถแทรกหรือผ่านเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ได้ (2) สามารถแยกจากเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ได้มี (3) มีประสิทธิภาพสูงในการรับอิเล็กตรอนจากเซลล์จุลินทรีย์ (4) มีประสิทธิภาพสูงในการปล่อยผ่านหรือส่งผ่านอิเล็กตรอนจากสารสื่อนำอิเล็กตรอนไปยังขั้วอิเล็คโทรด (5) ละลายน้ำได้ดีและมีความเสถียรสูง และ (6) ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์และสิ่งแวดล้อม (Mohan Y.;Kumar S. M. M.; และ Das D. . 2008;Wang Chin-Tsan;Chen Wei-Jung; และHuang Ruei-Yao. 2010:).

(3) ค่า Overpotential ของขั้วคาโทด ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นรีดักชั่นของสารรับอิเล็กตรอน เช่น ออกซิเจน กับโปรตอนเพื่อเกิดน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งการเกิดปฏิกิริยานี้ มักจะเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ดังนั้น ในบางระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ เพื่อป้องกันการสูญเสียความ Overpotential จึงมีการเติมสารออกซิไดเซอร์ เช่น hexacyanoferrate ดังนั้น เพื่อให้ค่า Overpotential ของขั้วคาโทดมีความเสถียร ขั้วแคโทดควรเป็นระบบเปิด (open-air cathodes) (Pham; และคนอื่น ๆ. 2004;Min Booki; และLogan Bruce E. 2004;Oh SangEun;Min Booki; และLogan Bruce E. 2004:)

(4) ศักยภาพของเยื่อเลือกผ่านโปรตอนเมมเบรน (proton exchange membrane; PEM) เยื่อเลือกผ่านโปรตอน (PEM) มีหลายชนิด ได้แก่ Nafion, Ultrex และ carbon paper(Liu Hong;Ramnarayanan Ramanathan; และLogan Bruce E. 2004:) เป็นต้น ทั้งนี้ Ultrex เป็นเยื่อเลือกผ่านโปรตอนเมมเบรนที่มีประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนโปรตอนสูงที่สุด

(5) ความต้านทานภายในของระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ ขึ้นกับค่าความต้านทานของขั้วอิเล็คโทรดและเยื่อเลือกผ่านโปรตอนเมมเบรน ดังนั้น ในทางปฏิบัติเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าสูงที่สุด ขั้วแคโทดและขั้วแอโนดควรถูกวางในตำแหน่งที่ใกล้กันมากที่สุด

(6) ค่า Overpotential ของขั้วแอโนด ขึ้นกับพื้นที่ผิวหน้าของขั้วแอโนด คุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมีของขั้วอิเล็คโทรด ความต่างศักย์ของขั้วอิเล็คโทรด กลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอนของสารสื่อนำอิเล็กตรอน (Mediator) และค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

คุณสมบัติที่ดีของสารสื่อนำอิเล็กตรอน ประกอบด้วย (1) สามารถแทรกหรือผ่านเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ได้ (2) สามารถแยกจากเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ได้มี (3) มีประสิทธิภาพสูงในการรับอิเล็กตรอนจากเซลล์จุลินทรีย์ (4) มีประสิทธิภาพสูงในการปล่อยผ่านหรือส่งผ่านอิเล็กตรอนจากสารสื่อนำอิเล็กตรอนไปยังขั้วอิเล็คโทรด (5) ละลายน้ำได้ดีและมีความเสถียรสูง และ (6) ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์และสิ่งแวดล้อม (Mohan Y.;Kumar S. M. M.; และDas D. . 2008;Wang Chin-Tsan;Chen Wei-Jung; และHuang Ruei-Yao. 2010:).

2.3 สารสื่อนำอิเล็กตรอนกับการพัฒนาการประสิทธิภาพระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

เนื่องจากสารสื่อนำอิเล็กตรอน (Mediator) เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าจากเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ ในแง่ของ ค่า Overpotential ของขั้วแอโนด การคัดเลือกของชนิดสารสื่อนำอิเล็กตรอนที่เหมาะสมต่อกลุ่มจุลินทรีย์หรือจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตกระแสไฟฟ้าจากเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพจึงมีความสำคัญอย่างมาก จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา ได้มีรายงานวิจัยอิทธิพลของเมทธิลลีนบลูที่ค่าความเข้มข้นจาก 50, 100, 200, 300, และ 400 ไมโครโมลาร์ ที่มีต่อการผลิตกระแสไฟฟ้าจาก *S.cerevisiae* ได้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่ 12.3 โมโครวัตต์ และปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ 232 ไมโครแอมป์ที่ความเข้มข้นของเมธทิลลีนบลู 300 มิลลิโวลต์ (Rahimnejad M.; และคนอื่น ๆ. 2011:) ในขณะที่เมธทิลลีนบลูที่ความเข้มข้น 50 100, 200, และ 400 ไมโครโมลาร์ ได้ค่ากระแสไฟฟ้าต่ำกว่าที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ ผลวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของเมธทิลีนบลูมีผลโดยตรงต่อการชักนำการเกิดกระแสไฟฟ้าและประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้า

นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาผลของการใช้เมธทิลออร์เร้ท์น(Methyl orange) และเมธทิลเรด (Methyl red) เป็นสารสื่อนำอิเล็กตรอนในการผลิตกระแสไฟฟ้าจาก activated sludge โดยใช้กลูเป็นแหล่งคาร์บอน (Hosseini Mir Ghasem; และAhadzadeh Iraj. 2013:) ปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ผลิตได้ (1) 106 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร (2) 164 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร และ (3) 207 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร เมื่อ (1) ไม่มีการเติมสารสื่อนำอิเล็กตรอน (2) เมื่อเติมเมทธิลออร์เร้นท์ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ (3) เมื่อเติมเมทธิลเรดความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ การเติมสารสื่อนำอิเล็กตรอนจะเพิ่มค่าระบบ open circuit potential ให้สูงขึ้น และไปลดค่าความต้านทานการเคลื่อนที่ของประจุส่งผลให้การเคลื่อนที่ของประจุลบหรืออิเล็กตรอนที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์

เคลื่อนที่ไปสู่ขั้วแอโนดได้มากขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

2.4 กลุ่มจุลินทรีย์อีเอ็มและกลุ่ม พด

เทคโนโลยีจุลินทรีย์อีเอ็ม หรือ Effective microorganism (EM) ค้นพบโดยศาสตราจารย์ ดอกเตอร์เทรุโอะ ฮิกะ ในปี 1980 (Higa Teruo; และParr F. James. 1994:) การผลิตจุลินทรีย์อีเอ็มเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ณ อุณหภูมิห้อง เทคโนโลยีจุลินทรีย์อีเอ็มเกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ การประยุกต์ใช้ การจัดการ และการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้แก่สิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นการเพิ่มความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการพัฒนาคุณภาพของดิน และคุณภาพของพืชเกษตรกรรมในแง่ของการเจริญของพืชและปริมาณผลผลิต นอกจากนี้ จุลินทรีย์อีเอ็มสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช การจัดการน้ำเสียหรือน้ำทิ้ง เป็นต้น (Higa T 1996:)

จุลินทรีย์อีเอ็มประกอบไปด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ธรรมชาติที่มีประโยชน์มากกว่า 80 ชนิด(Mohd Mustafa Al Bakri Abdullah; และคนอื่น ๆ. 2011:) และเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมและเป็นจุลินทรีย์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ (1) กลุ่มจุลินทรีย์ผู้ผลิต (positive (regeneration) (2) กลุ่มจุลินทรีย์ผู้ย่อยสลาย negative (decomposition) และ (3) กลุ่มจุลินทรีย์ฉวยโอกาส (Opportunists microorganism) ตัวอย่างของกลุ่มจุลินทรีย์อีเอ็ม เช่น Photosynthetic bacteria (*Rhodopseudomonas palustris* และ *Rhodobacter spaeroides*) lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei* และ *Streptoccus lactis*), yeast (*Saccharomyces* cerevisiae and *Candida utilis*), actinomyces (*Streptomyces albus* and *Streptomyces griseus*), fermenting fungi (*Aspergillus oryzae, Penicillium* sp และ *Mucor hiemalis*) (Diver S. . 2001:) และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus* sp.

2.5 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์อีเอ็มในเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา ได้กล่าวถึงการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ *S. cerevisiae*, *Bacillus sp* และ photosynthetic bacteria ในการผลิตกระแสไฟฟ้าจากเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพในระบบ two-compartment MFC (Sharma Suresh K; และBulchandani B. D. 2012:) ที่ประกอบด้วยขั้วแอโนดและคาโทดจากแผ่นนิกเกิ้ลขนาด 15 x 1 เซ็นติเมตร ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ในสาระลายลเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นสะพานเกลือ ระบบถังคาโทดประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50

มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และใช้เมธทิลลีน บลูเป็นสารสื่อนำอิเล็กตรอน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์) ผลการวิจัยพบว่า *B. subtilis* สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าที่ (1) 2.14 mA และ 1.07 mW/cm^3, (2) 1.01 mA และ 0.52 mW/cm^3 และ (3) 0.70 mA และ 0.38 mW/cm^3 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และแป้งเป็นสับสเตรตตามลำดับ ทั้งนี้ ค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จาก *B. subtilis* มีค่าสูงกว่าจาก *S.cerevisiae* ซึ่งมีค่ากระแสไฟฟ้า (1) 0.65 mA และ 0.37 mW/cm^3, (2) 0.64 mA และ 0.32 mW/cm^3, และ (3) 0.24 mA และ 0.17 mW/cm^3 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และแป้งเป็นสับสเตรตตามลำดับ ด้วยเหตุที่จุลินทรีย์ พด ประกอบด้วย *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus* sp. และ photosynthetic bacteria นั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำจุลินทรีย์อีเอ็มมาประยุกต์ใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ ทั้งนี้ผลการวิจัยเบื้องต้น ได้ยืนยันว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ โดยใช้แท่งถ่านคาร์บอน (Carbon brush) เป็นขั้วแอโนดและคาโทด และมีเมธทิลลีนบลูที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ เป็นสารสื่อนำอิเล็กตรอน ดังนั้น ระบบการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพในกระบวนการผลิตจุลินทรีย์อีเอ็ม จึงเรียกระบบนี้ว่า EM-MFC (Effective Microorganism – Microbial fuel cell)

ผลการวิจัยเบื้องต้น เป็นการใช้กลุ่มจุลินทรีย์อีเอ็มที่เป็นระบบเชื้อผสม (Mix culture) เป็นแหล่งผู้ผลิตกระแสไฟฟ้าจากระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ ซึ่งให้ประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าใกล้เคียงกับรายงานการวิจัยในอดีต (ตารางที่ 1) ที่มีทั้งการใช้กลุ่มจุลินทรีย์หรือเชื้อผสม และจุลินทรีย์สายพันธ์บริสุทธ์ (pure culture) ซึ่งยืนยันได้ว่าการใช้จุลินทรีย์หลายชนิดพร้อมกันในกลุ่มจุลินทรีย์เชื้อผสมที่มีกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ที่แตกต่างขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ ไม่ส่งผลต่อกระบวนการและประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

ตารางที่ 2 สับเสรตและชนิดจุลินทรีย์ที่แตกต่างที่ใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าจากเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

ชนิดของสารอาหาร	ความเข้มข้น	ชนิดจุลินทรีย์	ชนิดของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ (electrode surface area and/or cell volume)	Current density (mA/cm^2) ณ maximum power	เอกสารอ้างอิง
Acetate	1 g/L	Pre-acclimated bacteria from MFC	Cube shaped one-chamber MFC with graphite fiber brush anode (7170 m^2/m^3 brush volume)	0.8	(Logan B.E.; และคนอื่น ๆ. 2007:)
Arabitol	1220 mg/L	Pre-acclimated bacteria from MFC	One-chamber air-cathode MFC (12 mL) with non wet proofed carbon cloth as anode (2 cm^2) and wet proofed carbon cloth as cathode (7 cm^2)	0.68	(Catal T.; และคนอื่น ๆ. 2008b:)
Cellulose particles	4 g/L	Pure culture of *Enterobacter cloacae*	U-tube MFC with carbon cloth anode (1.13 cm2) and carbon fibers as cathode	0.02	(Rezaei F.; และคนอื่น ๆ. 2009b:)
Furfural	6.8 mM	Pre-acclimated bacteria from MFC	One-chamber air-cathode MFC with carbon paper anode and cathode (7 cm^2)	0.17	(Luo Y.; และคนอื่น ๆ. 2010:)
Galactitol	1220 mg/L	Pre-acclimated bacteria from MFC	One-chamber air-cathode MFC (12 mL) with non wet proofed carbon cloth as anode (2 cm^2) and wet proofed carbon cloth as cathode (7 cm^2)	0.78	(Catal T.; และคนอื่น ๆ. 2008b:)
Glucose	6.7 mM	Mixed bacterial culture maintained on sodium	One-chamber air-cathode MFC (12 mL) with non wet proofed carbon cloth as anode (2 cm^2) and wet proofed carbon cloth as	0.70	(Catal T.; และคนอื่น ๆ. 2008b:)

ชนิดของสารอาหาร	ความเข้มข้น	ชนิดจุลินทรีย์	ชนิดของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ (electrode surface area and/or cell volume)	Current density (mA/cm^2) ณ maximum power	เอกสารอ้างอิง
		acetate for 1 year (*Rhodococcus* and *Paracoccus*)	cathode (7 cm^2)		
Glucuronic acid	6.7 mM	Mixed bacterial culture	One-chamber air-cathode MFC (12 mL) with non wet proofed carbon cloth as anode (2 cm2) and wet proofed carbon cloth as cathode (7 cm^2)	1.18	(Catal T.; และคนอื่น ๆ. 2008b:)
Lactate	18 mM	Pure culture of *S. oneidensis* MR-1	Two-chambered MFC with graphite felt electrode (20 cm^2)	0.005	(Manohar A.K.; และMansfeld F. 2009:)
Landfill leachate	6000 mg/L	Leachate and sludge	Two-chambered MFC with carbon veil electrode (30 cm^2)	0.0004	(Greenman J.; และคนอื่น ๆ. 2009:)

(Pant Deepak; และคนอื่น ๆ. 2010:)

3. วัตถุประสงค์

(1) เพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบ และความชื้น ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidas, Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ระหว่างการเจริญของราขาว

(2) เพื่อประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพร่วมระหว่างการเจริญของราขาวและจุลินทรีย์กลุ่ม พด

4. วิธีทดลอง

4.1 อิทธิพลของชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบและความชื้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์

4.1.1 การเตรียมวัตถุดิบและหัวเชื้อ

(1) วัตถุดิบในการทดสอง ได้แก่ ฟางข้าว และแกลบ

การเตรียมฟางข้าว นำฟางข้าวที่แห้งและสะอาด ปราศจาการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ มาทำการตัดให้เป็นเส้นสั้นๆ ความยาว 1 เซนติเมตร จากนั้น นำมาเก็บในที่แห้ง เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

(2) การเตรียมแกลบ

แกลบที่นำมาใช้ต้องแห้ง สะอาด ปราศปราศจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เช่น ราดำ และไม่มีแมลง เช่น มอด ซึ่งจะก่อให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อราขาวได้

(3) ชนิดของราขาว ได้แก่ เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulas* Mont.) และเห็ดนางรมภูฐาน (*Pleurotus pulmonarius***)**

4.1.2 การเตรียมหัวเชื้อราขาว เห็ดขอนขาว และเห็ดนางรมภูฐาน ในข้าวฟ่างแดง

หัวเชื้อราขาว เห็ดขอนขาว และเห็ดนางรมภูฐาน ในข้าวฟ่างแดง สั่งซื้อมาจากชมรมเกษตรปลอดสารพิษ สำนักงานใหญ่ ทั้งนี้ ในการขยายหัวเชื้อราขาว จะทำการเลี้ยงบนข้าวฟ่างแดง ซึ่งเตรียมได้โดยนำข้าวฟ่างแดง ชนิดแห้งจำนวน 2 กิโลกรัม มาทำการคัดเลือกเมล็ดข้าวที่เสียทิ้ง ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำก๊อก 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าจะสะอาด จากนั้น นำเมล็ดข้าวฟ่างแดง ที่ล้างสะอาดแช่ในน้ำสะอาดเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นทำการล้างให้สะอาดจนกว่าจะหมดกลิ่นเห็นเปรี้ยว และนำมาทำการนึ่งจนกว่าจะสุกนิ่ม จากนั้นนำข้าวฟ่างแดง ที่สุกแล้วมาทำการพึ่งให้เกือบแห้งด้วยอากาศ บรรจุลงขวดสะอาดที่มีฝาปิดสนิทปริมาณ 3 ใน 4 ส่วนของปริมาตรขวด และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ขวดหัวเชื้อเห็ดที่เจริญเต็มที่ในข้าวฟ่างแดง (เส้นใยมีสีขาวสะอาด) นำมาเขย่าขวดเพื่อแยกเส้นใยของเห็ดบนเมล็ดข้าวฟ่างออกจากกัน จากนั้นนำหัวเชื้อเห็ด จำนวน 10 กรัม ใส่ลงในขวดขยายหัวเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และทำการบ่มเส้นใยเห็ดที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน

A. B.

http://www.thaikasetsart.com http://supon.siam2web.com/?cid=1164680

รูปที่ 2 A. เห็ดขอนขาว และ B. เห็ดนางรมภูฐาน

4.1.3 การเตรียมก้อนเชื้อเห็ด นำฟางข้าวและแกลบที่เตรียมแล้วจากข้อ 1 มาผสมรวมกันที่อัตราส่วนฟาง:แกลบ ที่ 1:0, 1:1 และ 0:1 โดยน้ำหนัก จากนั้นทำการผสมสารองค์ประกอบของสูตรอาหาร ดังในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 วัสดุองค์ประกอบต่าง ๆ ในการเตรียมก้อนเชื้อเห็ด

ชนิดของวัตถุดิบ	**ปริมาณที่ใช้ (กรัม)**
วัตถุดิบที่ใช้	1000
รำละเอียด	70
ใบกระถิ่นป่น	70
แป้งข้าวเหนียว	70
ภูไมท์ซัลเฟต	15
แร่มอลท์	15
ดีเกลือ	2
ยิบซั่ม	10
ปูนขาว	10
กากน้ำตาล	100
น้ำกลั่น (ปรับความชื้น)	65 - 75%

นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมให้เข้ากันดี จากนั้นปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 65% 70% และ 75% โดยทำการวัดค่าความชื้นในวัตถุดิบด้วยเครื่องวัดความชื้น (Wood powder Moisture meter) รุ่น TK100W จากนั้นทำการบรรจุลงในถุง (30 กรัม น้ำหนักวัตถุดิบแห้งก่อนปรับความชื้น) ใส่คอขวดและปิดจุกขอขวดให้สนิท จากนั้นนำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำหัวเชื้อเห็ดบริสุทธิ์จำนวน 10 กรัม เติมในถุงก้อนเห็ดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และทำการบ่มเส้นใยเห็ดนางรมภูฐานที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งเส้นใยเจริญเต็มถุง (นาน 30 - 60 วัน ขึ้นกับชนิดของรา)

4.2 การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อการเจริญของราขาว

3.2.1 ด้านสัดส่วนของฟางข้าวและแกลบ: อัตราส่วนโดยน้ำหนักของฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0, 1:1 และ 0:1 ให้ได้น้ำหนักสุดท้าย 30 กรัม (วิธีการเตรียมข้อ 1.6)

4.1 .2 ด้านความชื้นในก้อนเห็ดที่มีต่อการเจริญของราขาว: ที่ 65%, 70% และ 75% (วิธีการเตรียมข้อ 1.6)

4.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเจริญของเชื้อราขาว

การเจริญของราขาวทั้ง 2 ชนิด วัดจากกิจกรรมของเอนไซม์ 4 ชนิด ที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการย่อยสลายวัตถุดิบเพื่อนำไปใช้ในการเจริญ กิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำการศึกษาได้แก่ เอนไซม์ Laccase (E.C. 1.10.3.2), เอนไซม์ Lignin peroxidase (E.C. 1.11.1.14), เอนไซม์ Manganease peroxidase (MnP) (E.C. 1.11.1.13) และเอนไซม์ Catalase (E.C. 1.11.1.6)

4.3.1 การเตรียมตัวอย่างของเชื้อราขาว

นำก้อนเชื้อเห็ดที่มีการเจริญในระยะเวลาต่างๆ ปริมาณ 10 กรัม มาทำการบดแยกเส้นใยราออกจากกัน จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่า pH 6.0 จำนวน 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อแยกสารละลายเอนไซม์ออกจากตะกอน และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase

นำตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 10 mM DMP (2,6-dimetoxiphenol) ในสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate buffer ที่ความเข้มข้น 500 mM ที่ค่า pH 5.0 จากนั้นทำการบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

4.3.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Lignin peroxidas

นำตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมในสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 1 ml ของ 50mM sodium potassium tartarate buffer ที่ค่า pH 4, 0.1 ml ของ H_2O_2, และเติม methylene blue ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 32 uM จากนั้นนำมาทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 650 nm

ค่า% การลดลงของสี methylene blue คำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Decolourization of methylene blues} = \frac{A650\ Control - A650\ Test}{A650\ Control} X100$$

4.3.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Manganease peroxidase (MnP)

1 มิลลิลิตรของสารละลายสับสเตรท ประกอบด้วย 25 mM lactate, 0.1 mM MnSo4, 1 ml BSA, และ ตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 0.5 ml ที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM sodium succinate buffer mที่ค่า ph 4.5 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ MnP เริ่มขึ้นเมื่อทำการเติมด้วยสารละลาย H_2O_2 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mM จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาทีและหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 50 µl และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร ปฏิกิริยาของเอนไซม์คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

Enzyme activity assay = A610 for test assay –A610 for control assay

4.3.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Catalase

เตรียมสารละลายสับสเตรท 1 มิลิลิตร ที่ประกอบด้วย 65 mM H_2O_2 ในสารละลาย sodium phosphate buffer เข้มข้น 60 mM ที่ค่า pH 7.4 จากนั้นทำการเติมตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทำการวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย ammonium molydate ที่ความเข้มข้น 32.4 mM และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

4.4 การผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

ในขั้นตอนนี้ เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในควบคู่กับการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพร่วมระหว่างการเจริญของราขาวและจุลินทรีย์กลุ่ม พด

4.4.1 การผลิตจุลินทรีย์

สำหรับการเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ พด 2 นั้น ทำได้โดยการนำผงหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้ง มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลทรายความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และประกอบด้วย KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และ $(NH4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วย Autoclave จากนั้นนำสารละลายอาหารเหลวดังกล่าวที่ทำการเติมผงหัวเชื้อที่อัตราส่วนความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปเขย่าที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลาประมาณ 1 - 2 ชั่วโมง เพื่อทำการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปแบบผงแห้งเกิดการเจริญ

จากนั้น กล้าเชื้อที่ทำการเตรียมไว้ข้างต้น นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังแอโนดในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยใช้ปริมาตรอาหารเหลวเพาะเลี้ยงจำนวน 150 มิลลิลิตร และใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยมีการเติมสารสื่อนำอิเล็กตรอน (Mediator) ซึ่งได้แก่ เมทิลลีนบลู ที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิห้องโดยมีค่าอุณหภูมิโดยเฉลี่ยระหว่าง 30 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดค่า ^{o}Brix และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จนกระทั่งการเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

4.4.2 การสร้างระบบถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode

ชุดระบบถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพเพื่อการผลิตกระแสไฟฟ้าในการทดลองนี้เป็นชนิด H-type แบบ Biocathode ชุดถังประกอบด้วยถังแอโนดและถังคาโทดที่ผลิตจากถังพลาสติกขนาดเท่ากันที่สามารถบรรจุอาหารเหลวเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในปริมารตร 150 มิลลิลิตรได้อย่างพอดี ถังแอโนดและถังคาโทดเชื่อมต่อกันด้วยเมมเบรนเลือกผ่านชนิด Nefion membrane ขนาดพื้นที่หน้าตัด 3x3 ตารางเซนติเมตร ถังแอโนดจะบรรจุอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สามารถถูกปิดให้สนิท ถังแอโนดจะถูกจะเป็นช่องขนาดเล็กจำนวน 2 ช่อง สำหรับเทอร์โมมิเตอร์และช่องสำหรับการเก็บตัวอย่าง ซึ่งช่องเก็บตัวอย่างจะถูกปิดให้สนิทจนกว่าจะมีการเก็บตัวอย่าง ส่วนถังคาโทดจะเป็นระบบ Biocathode ซึ่งเป็นการใช้ระบบของถังแคโทดโดยมีการใช้สารเมตาบอไลซ์จากการเจริญของสิ่งมีชีวิตใด ๆ เป็นแหล่งรับโปรตอน ทั้งนี้ ในการทดลองนี้ ระบบ Biocathode จะเป็นการเพาะเลี้ยงราขาวด้วยระบบแบบ Solid state ในถัง Biocathode หรือ Cathode โดยบรรจุอาหารก้อนเพาะเลี้ยงราขาวที่ได้จากสภาวะที่ทำการคัดเลือกที่ให้การผลิตเอนไซม์ที่ดีที่สุด ราขาวที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นตอนที่แล้วจะนำมาเป็นหัวเชื้อราขาว ซึ่งหัวเชื้อราขาวนี้ต้องเจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างอย่างสมบูรณ์ โดยจะให้หัวเชื้อราขาวในจำนวน 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยทำการใส่หัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างที่ด้านบนของก้อนอาหารแข็ง ทั้งนี้ด้านบนฝากล่องแคโทดจะเจาะรูขนาดเล็กเพื่อให้เกิดการเคลื่อนที่ผ่านของออกซิเจนได้อย่างดี เพื่อเลียนแบบการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อในสภาวะปกติให้ได้มากที่สุด ขั้วแอโนดทำจากวัสดุคาร์บอนสำหรับทำแปลงถ่าน (carbon brush และขั้วคาโทดทำจากตาข่ายสแตนเลสสตีล) ขั้วแอโนดมีพื้นที่ผิวสัมผัสที่ 2.78 ตารางเซนติเมตร และขั้วคาโทดมีพื้นที่ผิวสัมผัสที่ 1.27 ตารางเซนติเมตร ซึ่งทั้ง 2 ขั้วจะเชื่อมต่อกันด้วยลวดทองแดงที่หุ้มผิวหน้าเส้นลวดด้วยพลาสติกหุ้มสายไฟปกติ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชชั่นของอิเล็กตรอนกับออกซิเจนในอากาศ (Sharma Suresh K; และBulchandani B. D. 2012:) ทั้งนี้ เส้นลวดทองแดงจะมีขนาดและความยาวเท่ากัน เพื่อป้องกันการคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์) เพื่อให้การผลิตกระแสไฟฟ้าจนกระทั่งระบบการผลิตกระแสไฟฟ้าเข้าสู่สภาวะสมบูรณ์ กำหนดความต้านทานภายนอกที่โหลดเข้าสู่ระบบมีค่า 100 โอห์ม อย่างไรก็ตาม ก่อนการดำเนินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพแบบ Biocathode ด้วยการเจริญของราขาวและจุลินทรีย์ พด 2 นั้น จะมีการดำเนินระบบทดสอบโดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พด ภายในถังแอโนด และทำการเติมน้ำกลั่นลงสู่ถังแคโทด เพื่อหาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ตลอดช่วงระยะเวลาการผลิตกระแสไฟฟ้า เพื่อใช้เป็นการทดลองเชิงบวกของการวิจัยนี้ ทั้งนี้เพื่อติดตามการทำงานของระบบ ตัวอย่างที่ทำการเก็บจะถูกนำไปวิเคราะห์หาน้ำตาลทั้งหมดและ ^{o}Brix เพื่อติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของระบบ

จากค่า current, voltages, power, volumetric power, volumetric current, current density และ voltage density

4.5 เทคนิคการวิเคราะห์

การวัดค่า Power และ volumetric power

ระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพนี้จะทำการวัดค่าการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยดิจิตอล มัลติมิเตอร์ ทุก ๆ 24 ชั่วโมง ค่ากำลังไฟฟ้า หรือ Power (*P*) และค่า volumetric power หรือ power density ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ (1) และ (2) (Sang-Eun Oh; และLogan Bruce E. 2006;Sukkasem Chontisa;และคนอื่น ๆ. 2011:)

$$P=V^2/R \quad (1)$$

Volumetric power = P/anode volume (m^3) (2)

ขณะที่ *V* คือ โวลต์ไฟฟ้า (voltage) และ *R* (Ω) คือค่าความต้านทาน

การวัดค่ากระแสไฟฟ้า Current และ volumetric current

ค่ากระแสไฟฟ้า (Current;*I*) และ volumetric current คำนวณได้จากสมการที่ (3) และ (4) (Sang-Eun Oh; และLogan Bruce E. 2006;Sukkasem Chontisa; และคนอื่น ๆ. 2011:).

$$I=V/R \quad (3)$$

Volumetric current = *I*/anode volume (m^3) (4)

การวัดค่าความหนาแน่นของค่ากระแสไฟฟ้าและโวลต์

ค่าความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้า (Current density) และค่าความหนาแน่นของโวลต์ไฟฟ้า (voltage density) คำนวณได้จากสมการที่ (5) และ (6) (Katuri Krishna P.; และคนอื่น ๆ. 2011:).

$$Current\ density = I/m^2 \quad (5)$$

$$Voltage\ density = V/m^2 \quad (6)$$

โดยที่ *I* และ *V* คือ ค่ากระแสไฟฟ้าและโวลต์ไฟฟ้า ตามลำดับ ขณะที่ m^2 คือ พื้นที่ผิวของขั้วแอโนดอิเล็คโทรด

การวัดค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการเจริญจะทำการวัดโดยเทคนิค Phenol sulfuric method โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม จำนวน 1 มิลลิลิตร มาผสมกันอย่างดีกับสารละลาย Phenol ที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นจำนวน 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างดี และทำการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในสารละลายตัวอย่างวิเคราะห์ได้กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่ค่าความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 and 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การวัดค่า °Brix

ค่า °Brix ของตัวอย่างสารละลายจุลินทรีย์วัดด้วย Hand reflectometer

5. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 อิทธิพลของชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบและความชื้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์

ในการศึกษาอิทธิพลของชนิด และสัดส่วนของวัตถุดิบ และความชื้นในก้อนเชื้อเห็ดที่มีการผลิตเอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidas Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ระหว่างการเจริญของราขาวที่อุณหภูมิห้อง 30± 3 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 56 วัน หรือ 8 สัปดาห์ ภายใต้สภาวะการเจริญที่แตกต่างกัน พบว่า

1) ที่ระดับความชื้นในก้อนเชื้อเห็ดที่ระดับเดียวกัน กิจกรรมของเอนไซม์ lignin peroxidase, manganese peroxidase, laccase และ catalase ที่ได้จากการเจริญของเห็ดขอนขาว (LSM) และเห็ดนางรมภูฐาน (PP) มีแนวโน้มไปทางเดียวกันและมีค่าที่ใกล้เคียงกัน โดยปริมาณของเอนไซม์เหล่านี้ จะเริ่มสูงขึ้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และกิจกรรมของเอนไซม์จะเริ่มคงที่เมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะเวลาระหว่างวันที่ 28 – 42 วัน หรือสัปดาห์ที่ 4 – 6 และการเจริญของเห็ดจะเริ่มคง หรือ ลดลง ตั้งแต่วันที่ 42 ของการเจริญเป็นต้นไป

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ระดับความชื้นต่างกัน ตั้งแต่ 65 – 75% เห็ดขอนขาว (LSM) และเห็ดนางรมภูฐาน (PP) มีอัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกัน คือ ที่ความชื้นในก้อนเชื้อเห็ด 70% กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด จะมีค่าสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ ที่ระดับความชื้น 75% และ 65% ตามลำดับ ดังปรากฏในรูปที่ 2 ถึง 9 และตารางที่ 4 ซึ่งที่ระดับความชื้น 70% นี้ ฟางข้าวและแกลบ ซึ่งเป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงสามารถอุ้มน้ำไว้ในตัวเองได้ดี โดยไม่มีน้ำส่วนเกินในก้อนเชื้อเห็ด โดยพบได้ในก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แกลบเป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงเพียงชนิดเดียว ระดับความชื้นในก้อนเชื้อเห็ดที่มากเกินไปหรือน้อยเกินไป ส่งผลให้เส้นใยเจริญได้ช้าหรือหยุดการเจริญของเส้นใยราได้

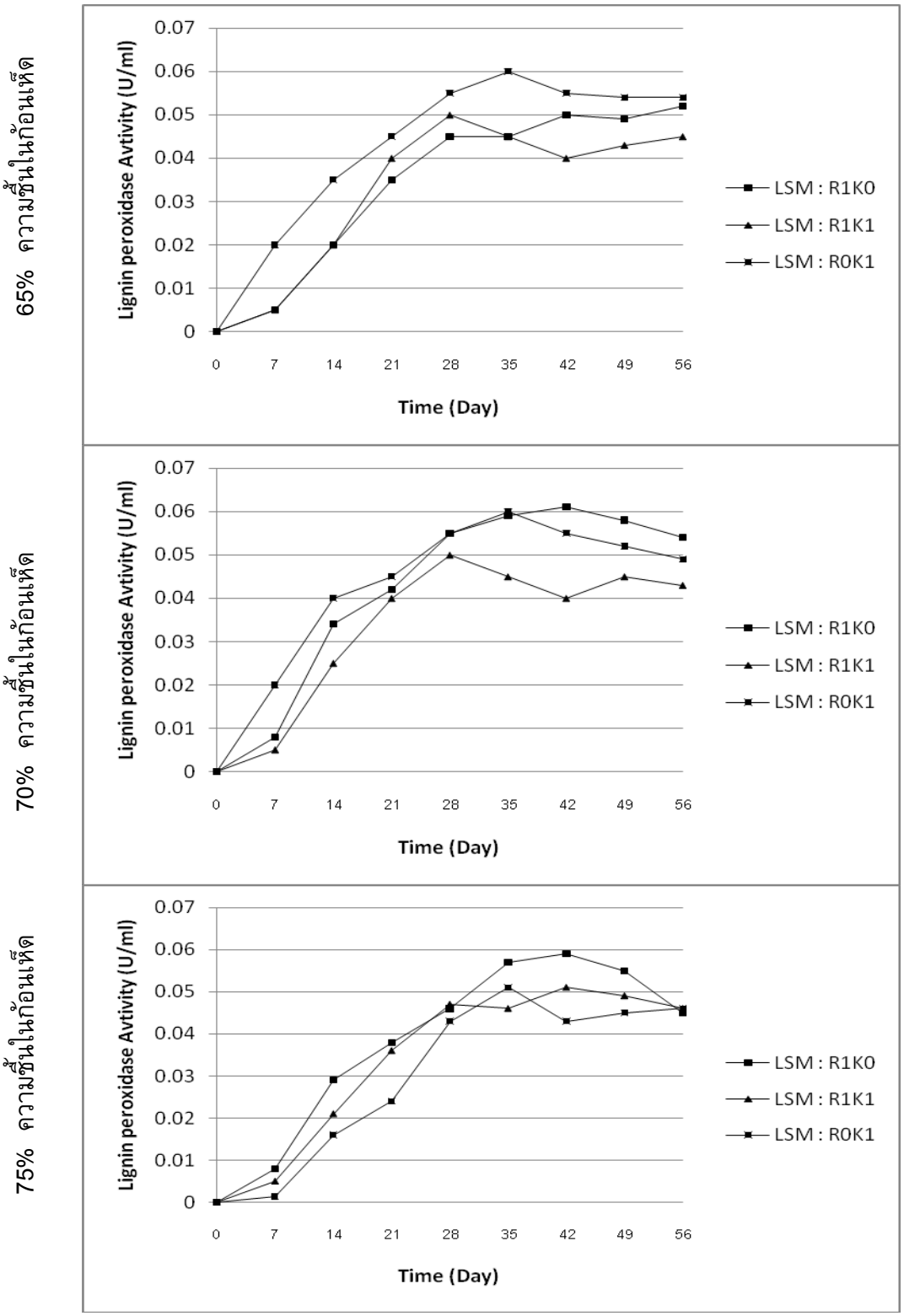
2) ชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบมีผลต่อการเจริญของราทั้ง 2 ชนิด และมีผลต่อการควบคุมหรือการรักษาความชื้นในก้อนเชื้อเห็ด เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุฟางข้าวและแกลบนั้น ฟางจะเก็บและรักษาความชื้นได้ดี อย่างไงก็ตาม เมื่อพิจารณาสัดส่วนอิทธิพลของวัตถุดิบ ณ ที่ระดับค่าความชื้นเดียวกันพบว่า ที่อัตราส่วนของฟางข้าวต่อแกลบที่ 1 : 1 (R1K1) จะมีอัตราการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase, laccase และ catalase ดีที่สุด (รูปที่ 2 ถึง 9 และตารางที่ 4) รองลงมาได้แก่ที่อัตราส่วน ฟางข้าวต่อแกลบที่ 1 : 0 (R1K0) และ ที่ 0:1 (R0K1) ตามลำดับ เนื่องจากการเลี้ยงราขาวโดยใช้แกลบทั้งหมด ความสามารถในการรักษาความชื้นจะมีผลต่อการเจริญ

โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับความชื้น 65 และ 75% ยกเว้นกิจกรรมของเอนไซม์ lignin peroxidase ที่แสดงค่ากิจกรรมสูงที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในวัสดุที่อัตราส่วน ฟางข้าวต่อแกลบที่ 1 : 0 (R1K0)

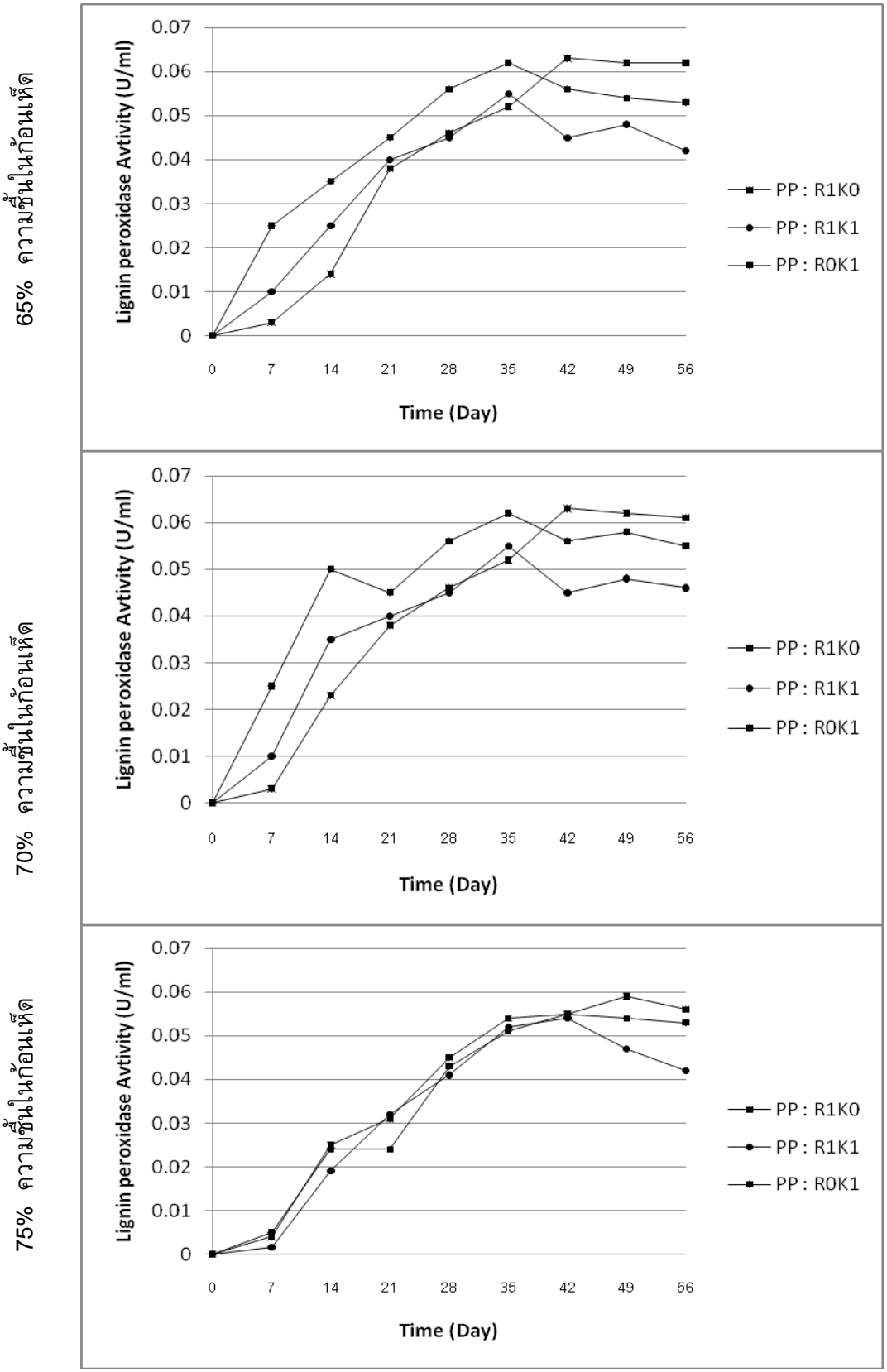
การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ผลิตขึ้นระหว่างการเจริญของเห็ดทั้ง 2 ชนิด ในก้อนเชื้อเห็ด แสดงในตารางที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นจากการทดลอง ซึ่งจะพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละสภาวะการเพาะเลี้ยง มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ช่วงค่าสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์ Manganese peroxidase, laccase, lignin peroxidase และ catalase ของเห็ดขอนขาวและเห็ดนางรมภูฐาน ได้แก่ที่ระดับความชื้นในก้อนเชื้อเห็ดระหว่าง 70-75 % โดยใช้ฟางข้าวและแกลบผสมร่วมกันที่อัตราส่วน 1:1 หรือใช้ฟางข้าวเพียงอย่างเดียวในการเป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงเห็ด เพื่อจะนำไปสู่การศึกษาความสามารถในการออกดอกเห็ด ปริมาณดอกเห็ดที่ได้ และนำไปใช้ในโครงการวิจัยในระยะที่ 2 ต่อไป เพื่อทดสอบหาสภาวะของระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพในการผลิตกระแสไฟฟ้าโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราขาวที่คัดเลือกได้แก่ การเลี้ยงราขาวจากเห็ดนางรมภูฐานในขั้วคาโทดและเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พด.2 ของประเทศไทย ในขั้วอาโนดต่อไป

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidase, Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ที่ผลิตขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ด ที่ระยะเวลาการเจริญ 42 วัน

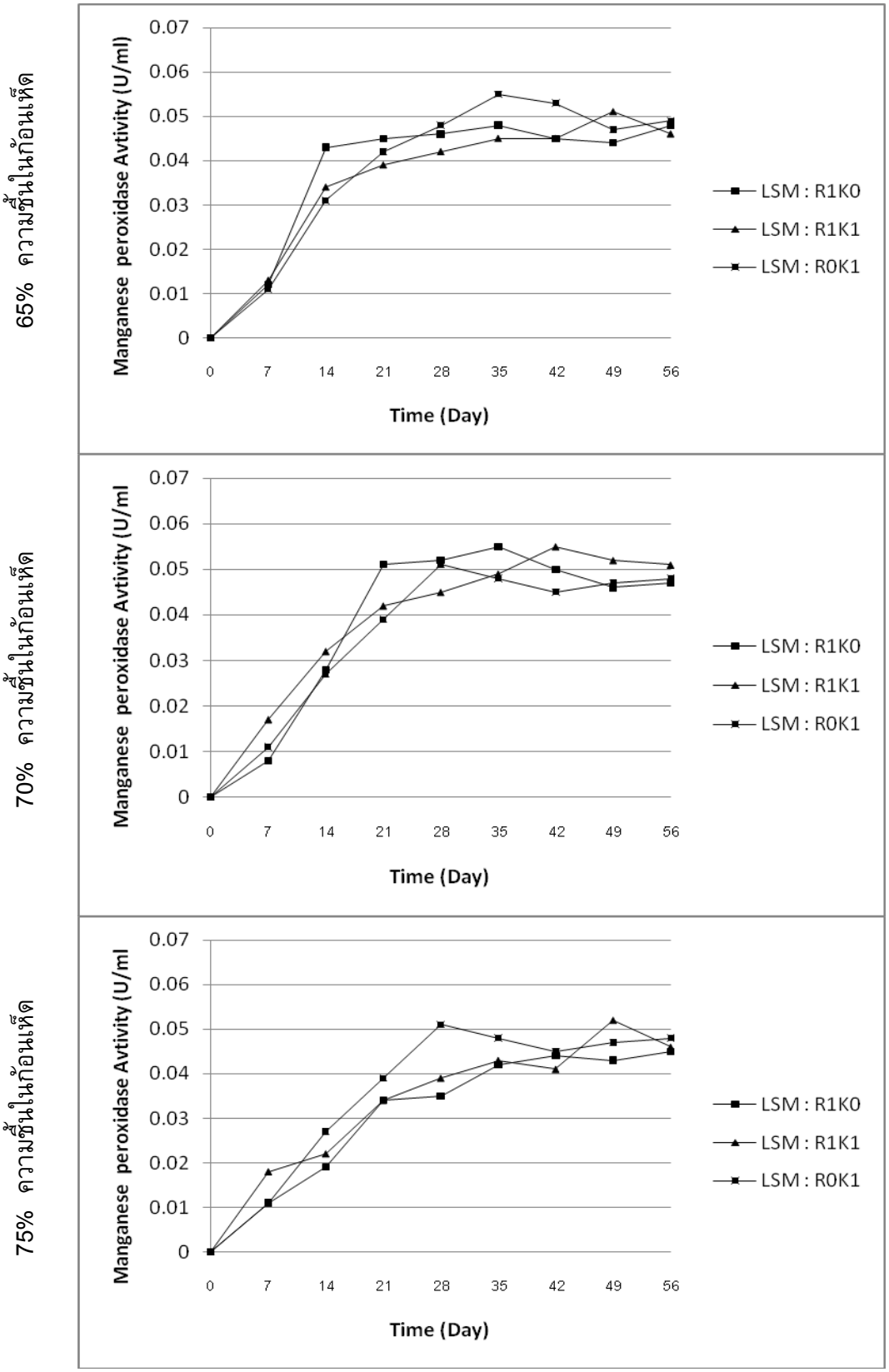
ชนิด	ระดับความชื้นในก้อนเห็ด (%)	อัตราส่วนฟางข้าว: แกลบ	Enzyme activity (U/ml)			
			Laccase	Lignin peroxidase	Manganease peroxidase	Catalase
เห็ดขอนขาว (LSM)	65	1:0(R1K0)	0.042	0.05	0.045	0.039
		1:1(R1K1)	0.046	0.04	0.045	0.046
		0:1(R0K1)	0.042	0.055	0.053	0.037
	70	1:0(R1K0)	0.039	0.061	0.05	0.042
		1:1(R1K1)	0.055	0.04	0.055	0.038
		0:1(R0K1)	0.033	0.055	0.045	0.034
	75	1:0(R1K0)	0.033	0.059	0.044	0.042
		1:1(R1K1)	0.043	0.051	0.041	0.042
		0:1(R0K1)	0.049	0.043	0.045	0.047
ชนิด	**ระดับความชื้นในก้อนเห็ด (%)**	**อัตราส่วนฟางข้าว: แกลบ**	**Enzyme activity (U/ml)**			
			Laccase	**Lignin peroxidase**	**Manganease peroxidase**	**Catalase**
เห็ดนางรมภูฐาน (PP)	65	1:0(R1K0)	0.042	0.063	0.047	0.039
		1:1(R1K1)	0.046	0.045	0.035	0.046
		0:1(R0K1)	0.042	0.056	0.043	0.037
	70	1:0(R1K0)	0.039	0.063	0.047	0.051
		1:1(R1K1)	0.055	0.045	0.059	0.046
		0:1(R0K1)	0.033	0.056	0.059	0.033
	75	1:0(R1K0)	0.051	0.055	0.047	0.051
		1:1(R1K1)	0.046	0.054	0.045	0.052
		0:1(R0K1)	0.051	0.055	0.043	0.043



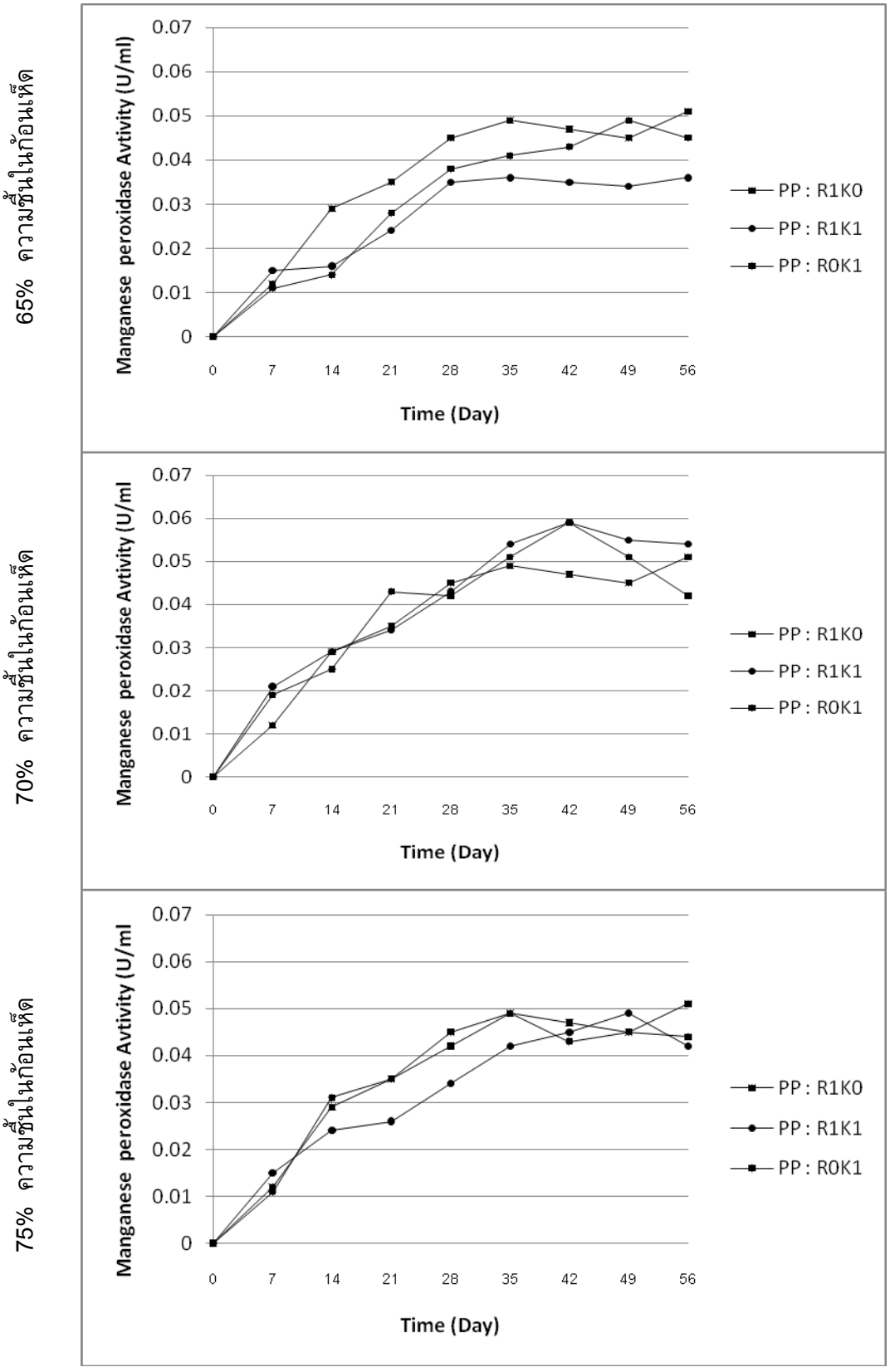
รูปที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ Lignin peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)



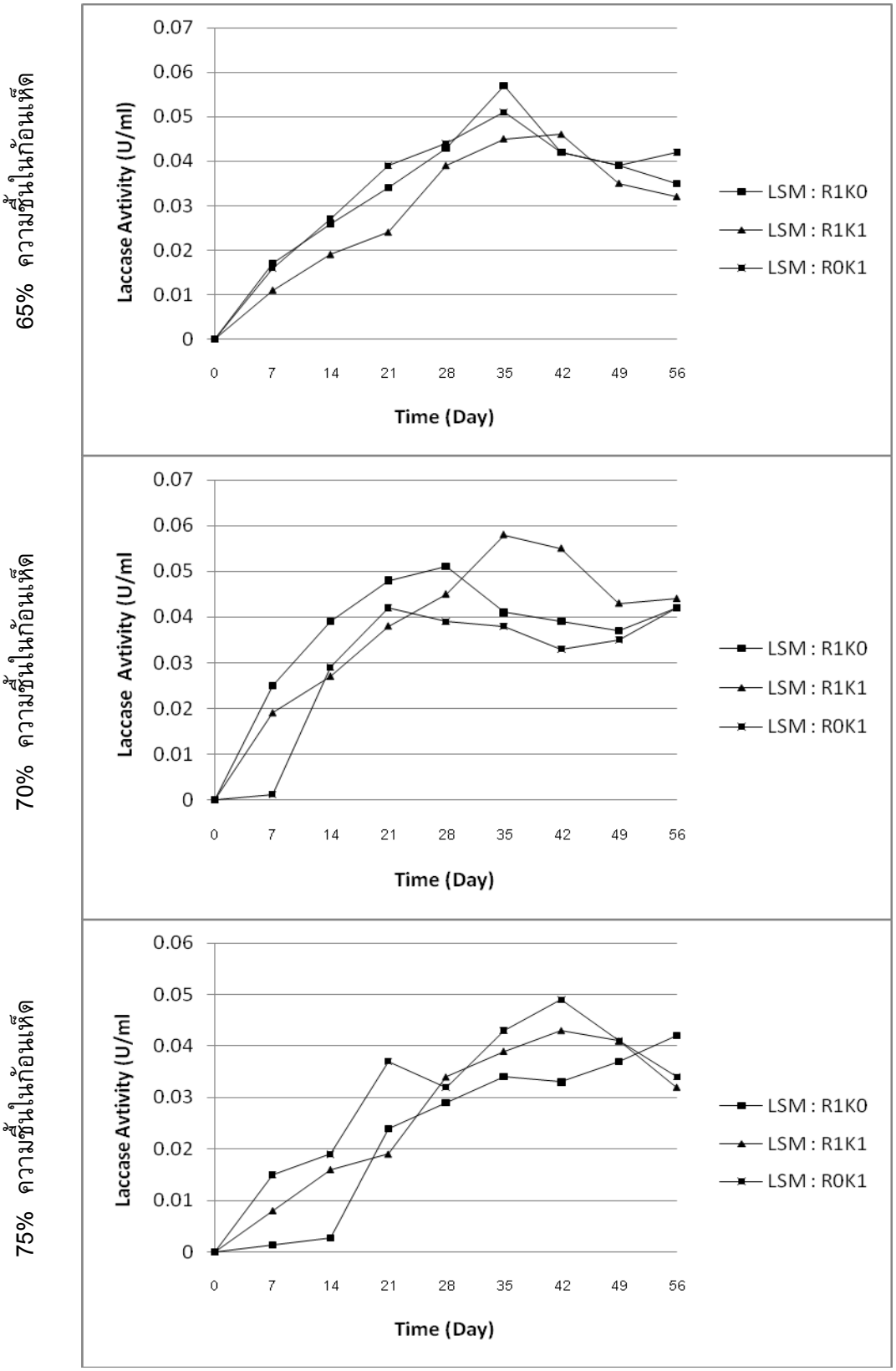
รูปที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ Lignin peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อ เห็ดนางรมภูฐาน (PP),อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)



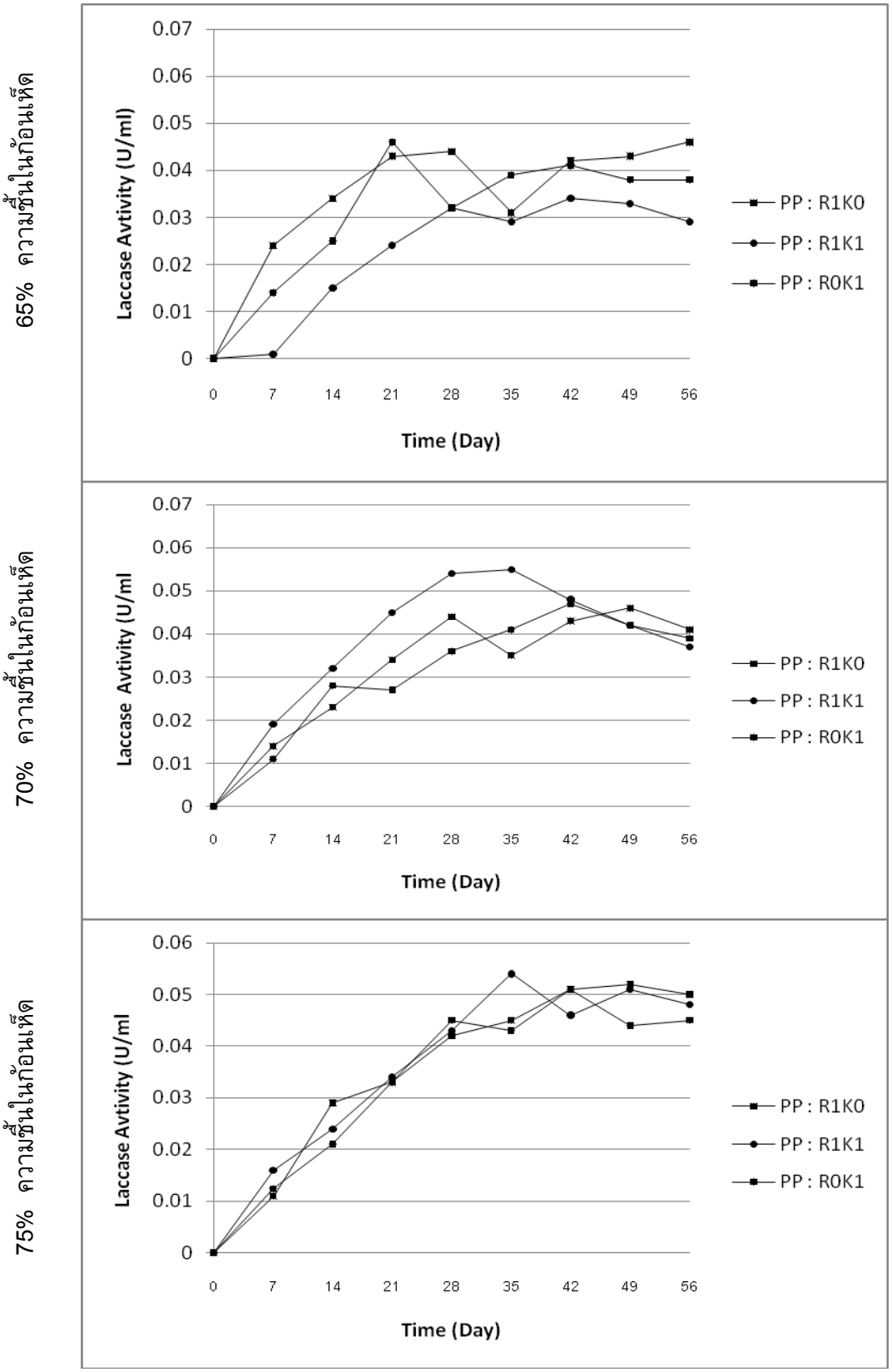
รูปที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)



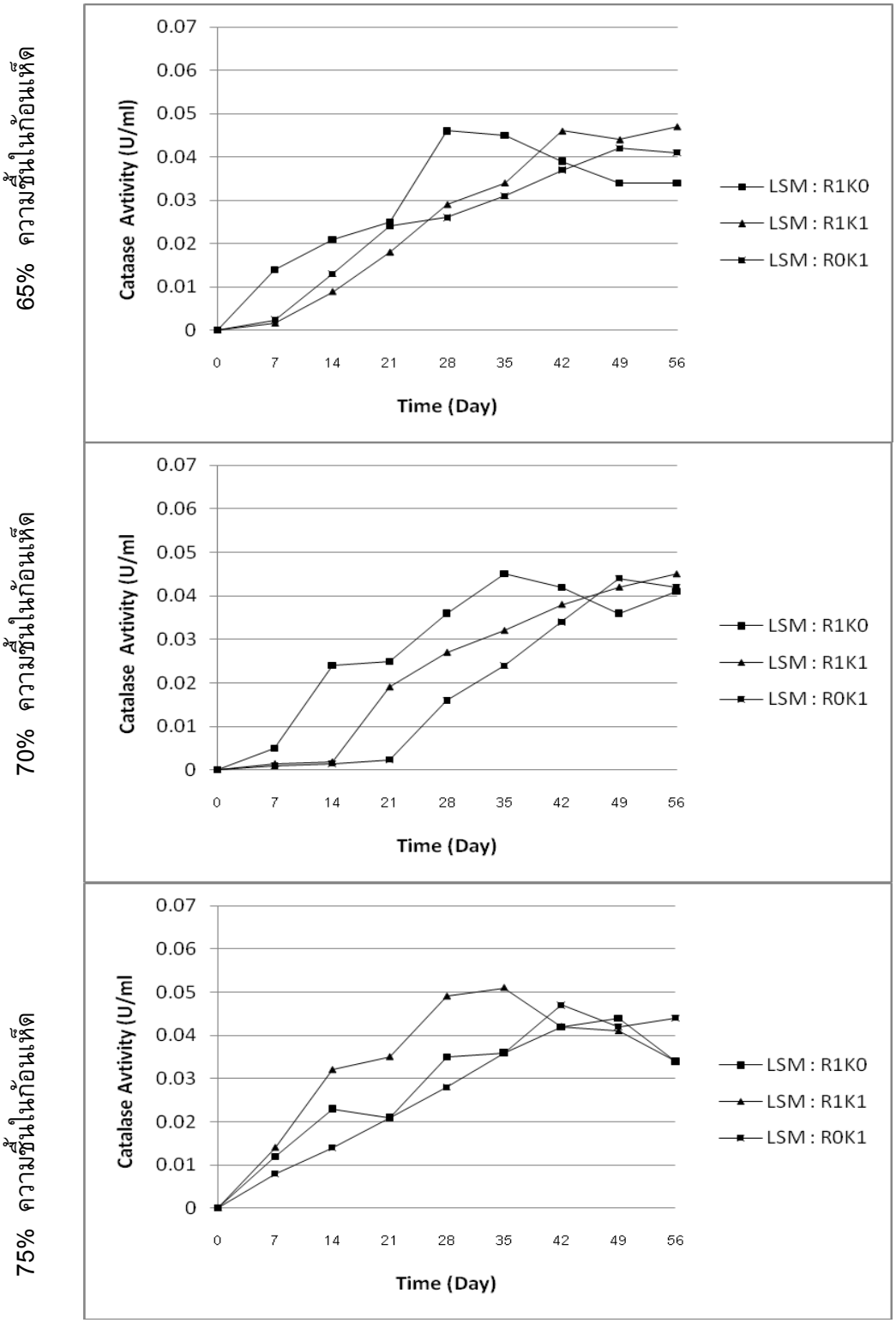
รูปที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0 (R1K0), 1:1 (R1K1) และ 0:1(R0K1)



รูปที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ Laccase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)

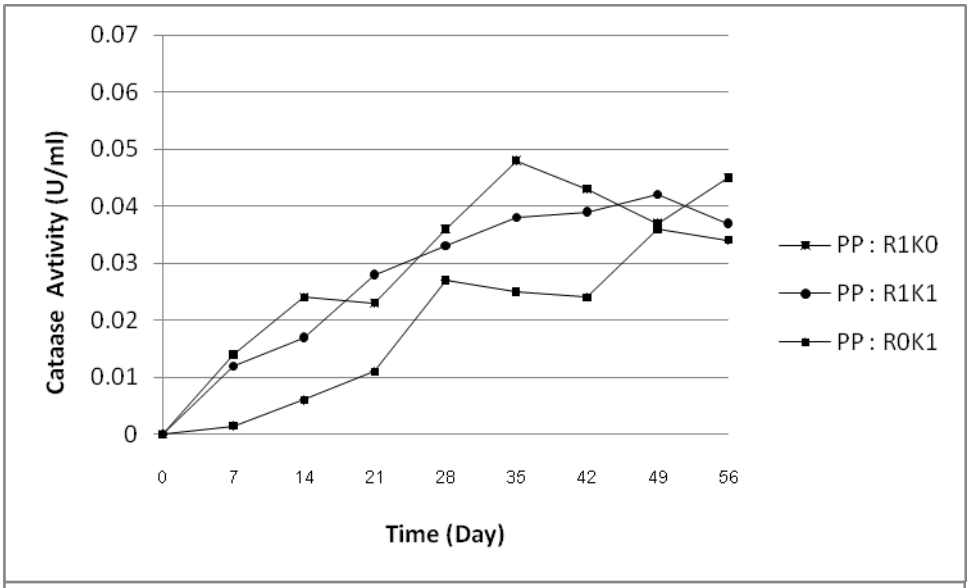


รูปที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ Laccase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1

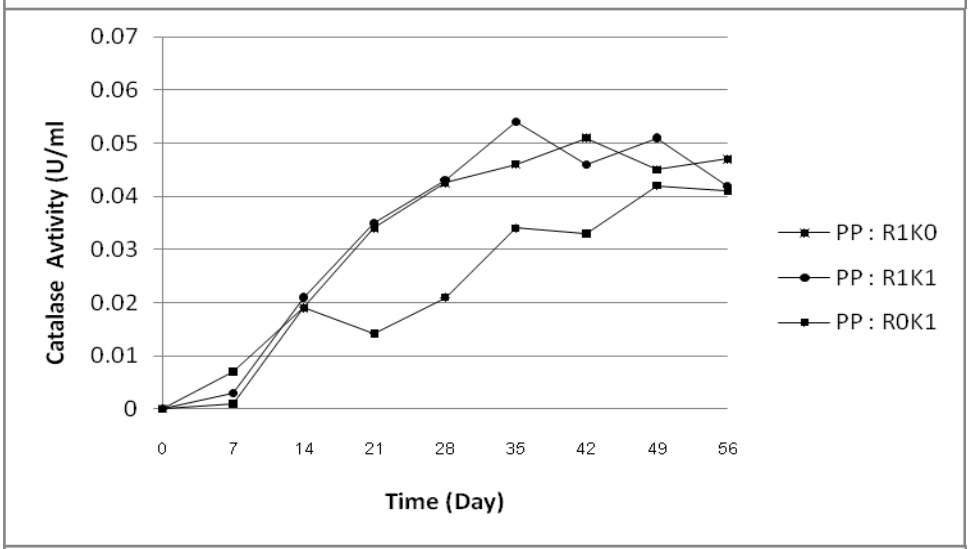


รูปที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM), ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)

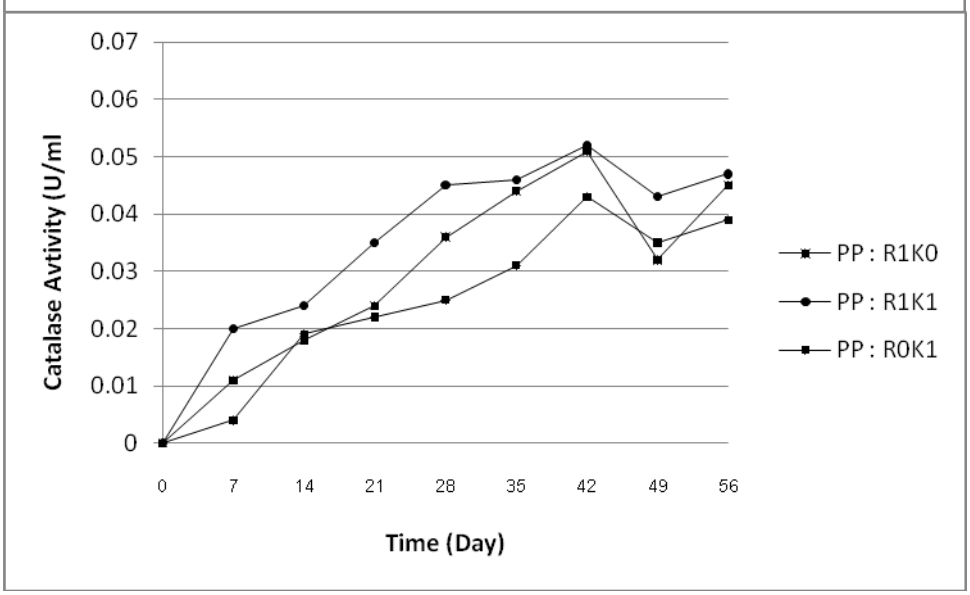
65% ความชื้นในก้อนเห็ด



70% ความชื้นในก้อนเห็ด



75% ความชื้นในก้อนเห็ด



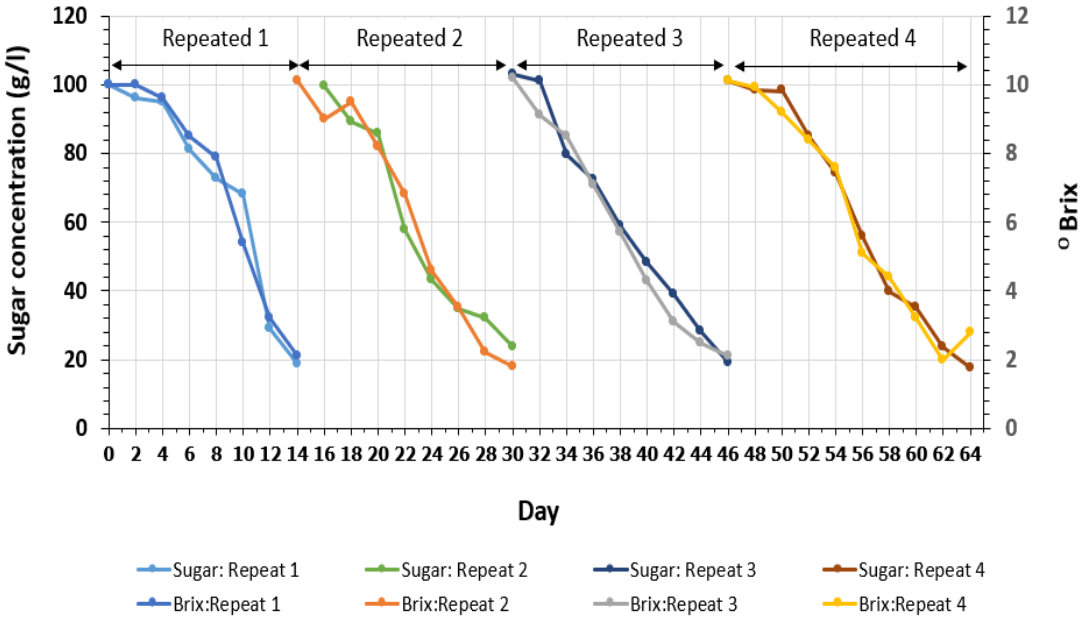
รูปที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)

5.2 ผลประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

การทดลองในขั้นนี้ เป็นการทดสอบเพื่อประเมินความเป็นไปได้ของการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพด้วยระบบ Biocathode ด้วยการเพาะเลี้ยงราขาวจากเห็ดนางรมภูฐานในระบบการเพาะเลี้ยงแบบ Solid state โดยใช้สภาวะที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ผ่านมา ได้แก่ ทำการเพาะเลี้ยงที่ระดับความชื้นในก้อนเชื้อเห็ดระหว่าง 70-75 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ฟางข้าวและแกลบผสมร่วมกันที่อัตราส่วน 1:1 เป็นส่วนประกอบหลักของก้อนเชื้อหลัก

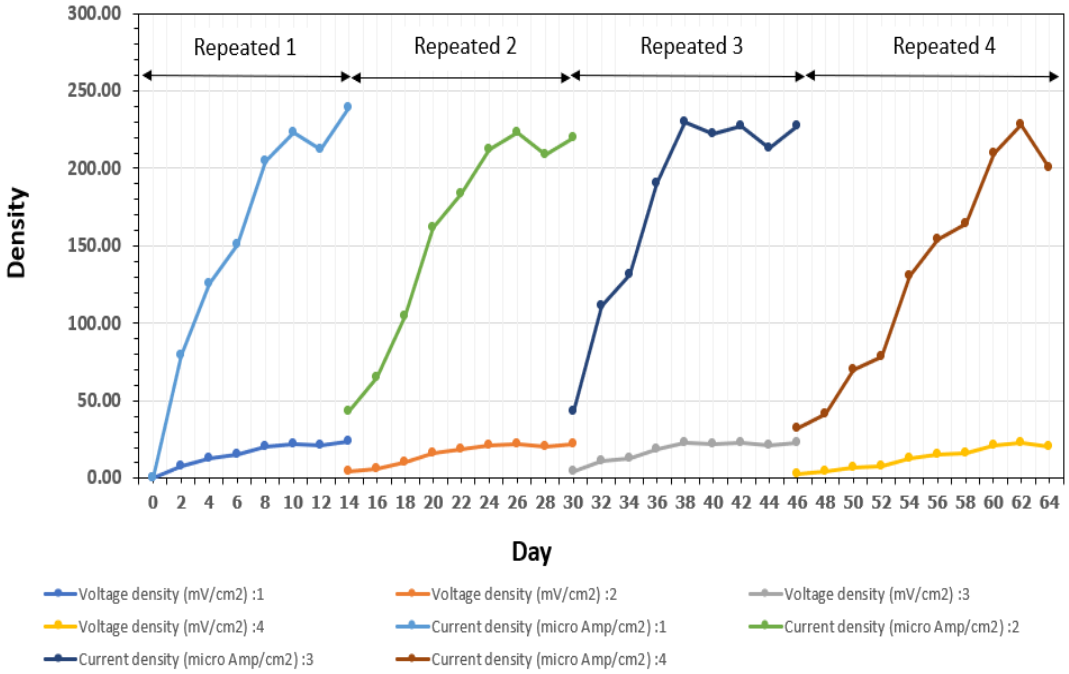
5.2.1 การผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยจุลินทรีย์ พด โดยใช้น้ำเป็นตัวรับโปรตอน

ผลการทดลองนี้ แสดงถึงประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพที่มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ พด 2 ระหว่างการเจริญในถังแอโนด โดยมีน้ำเป็นตัวรับโปรตอนซึ่งถูกบรรจุในถังแคโทด ทั้งนี้ เนื่องจากการเจริญของเชื้อราใช้เวลานานในช่วงระหว่าง 45 วัน ถึง 60 วัน จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พด 2 ถูกทำให้เกิดขึ้นด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำ (Repeated batch) โดยทุกครั้งของการเปลี่ยนถ่ายอาหารเหลวเก่าออกจากระบบและทดแทนด้วยอาหารเหลวใหม่นั้น อาหารเพาะเลี้ยงเก่านั้น คงเหลืออยู่ในระบบประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรของปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมด เพื่อทำหน้าที่เป็นหัวเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบซ้ำในรอบถัดไป ซึ่งจุลินทรีย์จะถูกทำการเพาะเลี้ยงแบบซ้ำทั้งหมด 4 รอบ ในระยะเวลาการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบทั้งหมด 64 วัน ซึ่งได้มีการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของน้ำตาล, ค่า ^{o}Brix, Current density, voltage density และ power density ทั้งนี้กำหนดให้พื้นที่ผิวของขั้วแอโนดเท่ากับ 2.78 ตารางเซนติเมตร และ พื้นที่ผิวของขั้วแคโทดเท่ากับ 2.5 ตารางเซนติเมตร การเปลี่ยนแปลงของค่าความสัมพันธ์ดังกล่าวดังแสดงในรูปต่อไปนี้



รูปที่ 11 การเจริญของจุลินทรีย์ในถังแอโนดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

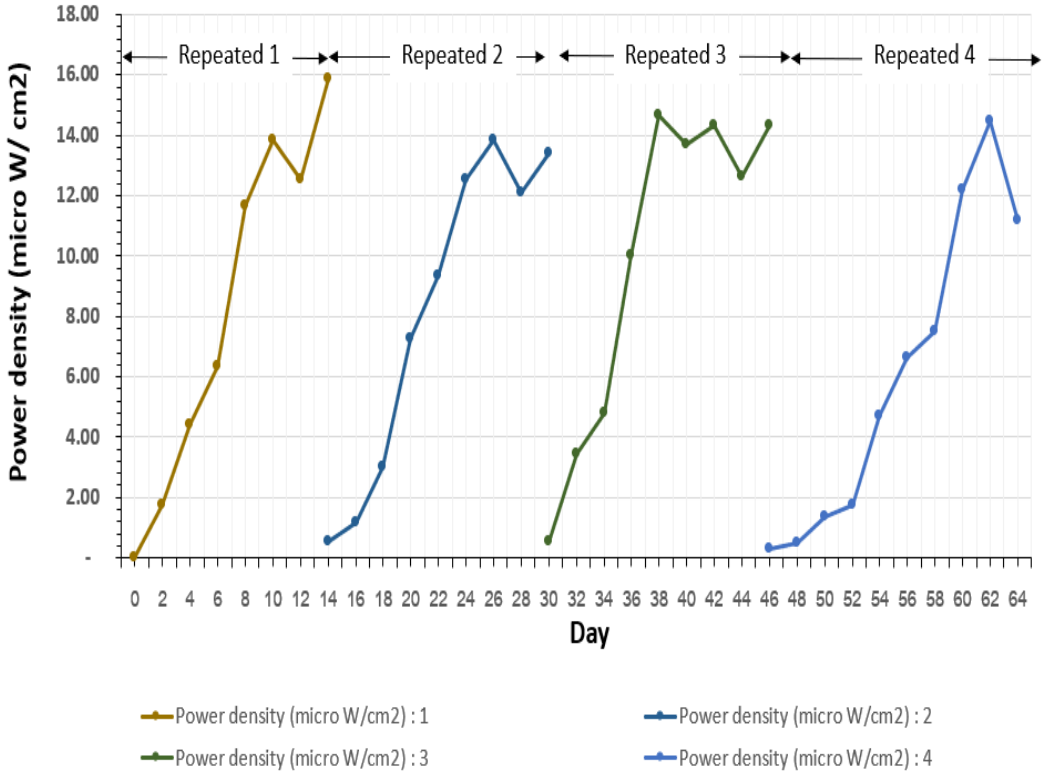
ในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์แบบกะในครั้งแรก (Repeated 1) การเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้นค่อนข้างรวดเร็ว ซึ่งเห็นได้จากการลดลงของความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด และค่า °Brix อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ ในวันที่ 14, 30 และ 46 ของการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นน้ำตาลสูงขึ้นหลังการเติมอาหารเหลวใหม่เข้าไปทดแทนอาหารเหลวเพาะเลี้ยงเก่า ซึ่งแสดงว่าจุลินทรีย์ที่หลงเหลือในระบบการเพาะเลี้ยงหลังจากการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่มีความแข็งแรงสมบูรณ์ดี และพร้อมเจริญเติบโตใหม่ได้ทันทีหลังการเติมอาหารเหลวใหม่ ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้ให้เห็นการเจริญของจุลินทรีย์ในช่วงระยะ Lag phase นั้นหายไป คงเหลือไว้ในช่วง exponential phase และ stationary phase ในระยะสั้น ๆ เท่านั้น ซึ่งแสดงว่าจุลินทรีย์ยังคงอยู่ในช่วงของเซลล์ที่มีความแข็งแรงและยังไม่เข้าสู่ระยะ dead phase ซึ่งไม่พบในการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำในครั้งที่ 1 ถึง 3 และพบการเจริญลดลงเล็กน้อย ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงการเข้าสู่ระยะ dead phase เล็กนั้น ในกะซ้ำครั้งที่ 4



รูปที่ 12 ค่าการเปลี่ยนแปลง Voltage density และ Current density ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

อย่างไรก็ตาม รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่า Current density, voltage density และ power density มีความสอดคล้องสัมพันธ์ต่อรูปแบบการเจริญ (Growth curve) ของจุลินทรีย์ ซึ่งพบว่า เมื่อจุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง exponential phase ซึ่งเป็นช่วงที่กระบวนการเมตาบอลึซึมของเซลจุลินทรีย์เกิดขึ้นอย่างเต็มที่เพื่อมีการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสที่เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับใช้ในการเจริญและเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ ซึ่งในช่วงนี้เอง ที่มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนจากกระบวนการเมตาบอลึซึมจากภายในเซลล์จุลินทรีย์สู่ภายนอกไปยังอาหารเหลวเพาะเลี้ยง อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ จะถูกพาไปยังขั้วแอโนดโดยสารเมทิลลีนบลูที่เติมเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยง พร้อมการเกิดการเคลื่อนที่ของสารที่ให้ประจุบวก หรือ สารโปรตอนผ่านไปยังถังแคโทดทางเมมเบรนเลือกผ่าน Nefion ซึ่งการเกิดกระแสไฟฟ้าขึ้นในระบบเซลล์เพลิงจุลชีพนี้ ยืนยันให้เห็นถึงความสามารถในการนำจุลินทรีย์พด 2 มาใช้เป็นแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนในถังแอโนดได้ แต่อย่างไรก็ตาม ค่า Current density, voltage density และ power density นี้ มีค่าในระดับค่อนข้างต่ำมาก หากเปรียบเทียบกับการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงทางเคมี ดังนั้น การพัฒนาระบบเซลล์

เชื้อเพลิงจุลชีพ ควรมุ่งเน้นวัสดุที่นำมาใช้เป็นขั้วอิเล็คโทรด หรือขั้วคาโทด ซึ่งต้องมีความไวต่อการนำไฟฟ้าสูง สามารถรับอิเล็กตรอนและนำพาอิเล็กตรอนได้อย่างมีแม้ว่าจะมีความเข้มข้นอิเล็กตรอนต่ำก็ตาม และที่สำคัญที่สุด คือ วัสดุที่นำมาทำขั้วไฟฟ้านั้น ไม่ควรมีความเป็นพิษกับเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อส่งเสริมให้การเจริญของจุลินทรีย์เป็นไปอย่างปกติ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าสูงสุดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพได้เป็นอย่างดี

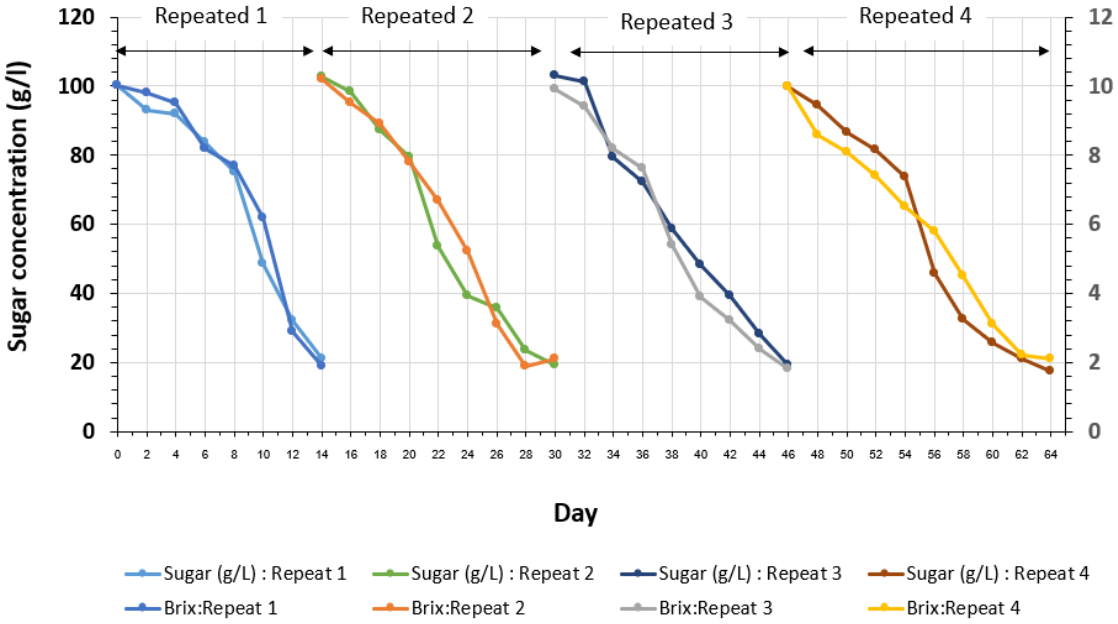


รูปที่ 13 ค่าการเปลี่ยนแปลง Power Density ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

5.2.2 การผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยจุลินทรีย์พด ร่วมระหว่างการเจริญของราขาว

การทดลองในขั้นนี้ เนื่องจากไม่สามารถทำการเก็บตัวอย่างก้อนอาหารตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงราขาวได้เช่นในการทดลองขั้นต้นเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ ดังนั้น หากราขาวไม่สามารถเจริญได้ดีตามปกติ จะไม่สามารถตรวจพบการเกิดขึ้นหรือการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าได้ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพได้ เนื่องจาก ระหว่างการเจริญของราขาว จะมีการปลดปล่อยสารที่มี

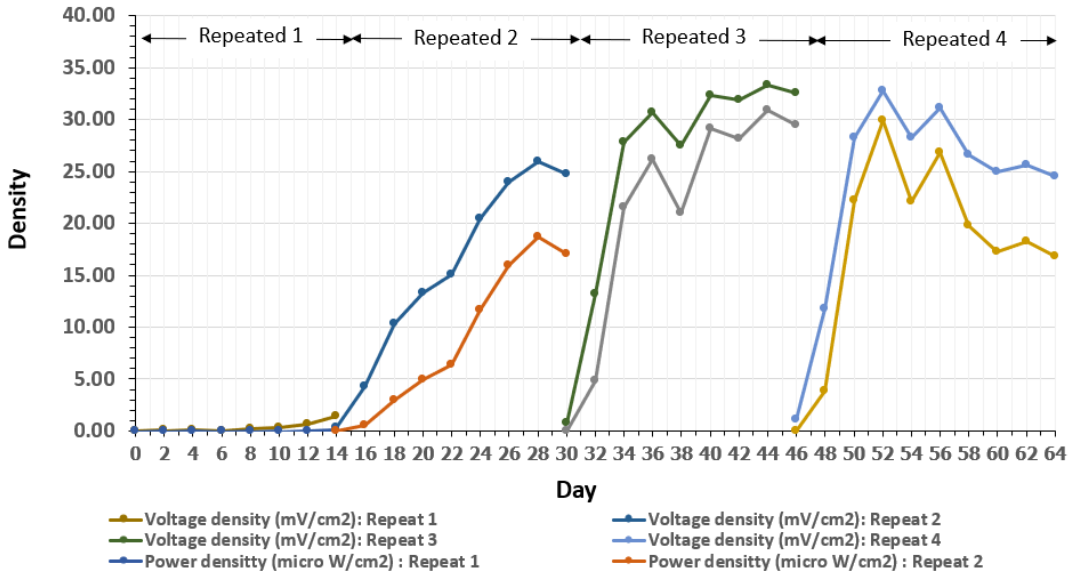
ประจุบวกจำนวนมาก และความแรงของสารประจุบวกที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเจริญของราขาว มีค่าความแรงของประจุบวกสูงกว่าน้ำมาก ซึ่งจะทำให้เกิดการเคลื่อนไหลของอิเล็กตรอนและโปรตอนได้อย่างครบวงจรและเกิดกระแสไฟฟ้าในระบบในที่สุด ดังนั้น หากการเจริญของราขาวลดลงหรือยุติลง สารประจุบวกหรือโปรตรอนเหล่านี้ จะไม่ถูกผลิตขึ้น ซึ่งทำให้การเคลื่อนไหลของอิเล็กตรอนและโปรตอนเกิดขึ้นในรูปแบบไม่ครบวงจรไฟฟ้า ดังนั้น จึงส่งให้ระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพนี้ ไม่สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้ในที่สุด



รูปที่ 14 การเจริญของจุลินทรีย์ในถังแอโนดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพในระบบ Biocathode

ทั้งนี้ หากพิจารณาในการเพาะเลี้ยงระยะกะช้าครั้งที่ 1 (ระยะเวลาประมาณ 14 วันแรกของการดำเนินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ) ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์ในถังแอโนดจะเจริญได้อย่างเต็มที่ แต่การเจริญของรายังเกิดขึ้นไม่มากนัก เป็นเหตุให้สารเมตาบอไลท์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมหลักของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดยังไม่มากนัก เนื่องจากราที่อยู่ด้านบนของก้อนอาหารยังไม่เจริญลงมาสู่ด้านล้างและสัมผัสกับแผ่นสแตนเลสซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้วแคโทด ทำให้การเคลื่อนผ่านของสารที่ให้ประจุบวกหรือโปรตอนจากถังแอโนดมายังถังแคโทดไม่ได้สัมผัสและรวมตัวกับสารเมตาบอไลท์ที่ได้จากการเจริญของรามากนัก อย่างไรก็ตาม การเกิดกระแสไฟฟ้านี้

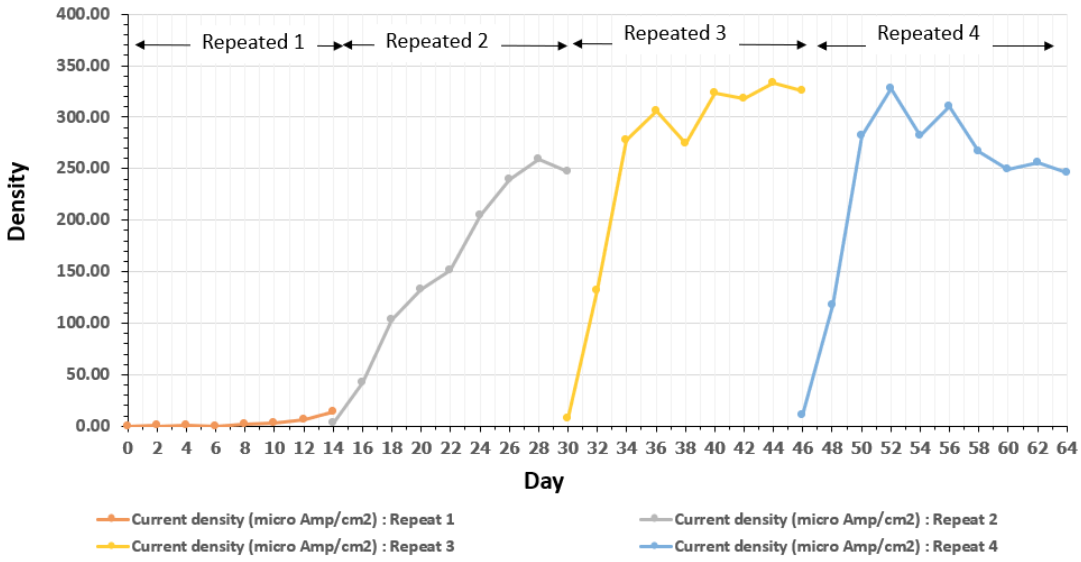
ความชื้นภายในก้อนเชื้ออาหารรามีความสำคัญอย่างมาก ที่จะทำให้การเข้าจับของโปรตอนกับสารรับโปรตอนเกิดประสิทธิภาพ ทั้งนี้ เนื่องจากในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพด้วยระบบทางชีววิทยาในถังแคโทด ซึ่งเรียกว่า biocathode ซึ่งในสภาวะนี้ จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตที่ทำการเพาะเลี้ยงในถังแคโทดจะถูกเลี้ยงไว้ในสภาวะอาหารเหลว ซึ่งมีการกวนเล็กน้อย ส่งผลให้เกิดการกระจายตัวของสารเมตาบอไลซ์ที่เกิดจากการเจริญในถังแคโทดอย่างสม่ำเสมอ ไม่มีการขัดขวางการเคลื่อนที่และการเข้าจับกันของสารประจุบวก ประจุลบ อิเล็กตรอน และโปรตอน ส่งผลให้ประสิทธิภาพการของระบบเซลล์เชื้อเพลิงมีความเสถียรสูง และเสถียรกว่า Biocathode ที่เป็นระบบ solid state เช่นการเจริญของราขาวในการทดลองนี้เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ การเจริญของราขาวในการทดลองนี้ ไม่สมบูรณ์เพียงพอที่จะให้เกิดการออกดอกเห็ด โดยการเจริญยังคงอยู่ในรูปของเส้นใยเป็นหลัก



รูปที่ 15 ค่าการเปลี่ยนแปลง Voltage และ Power Density ในเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด, ค่า ^{o}Brix, ค่า Power density, Current density, และ Voltage density ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในถังแคโทดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ และการเจริญของจุลินทรีย์ในถัง

แอโนด ทั้งนี้ การเจริญของราขาวใช้ระยะเวลาโดยเฉลี่ยนประมาณ 45 วัน จนกระทั่งการเจริญของเส้นใยราสมบูรณ์ และการเจริญจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น จะกระทั่งในช่วงระยะเวลาการเจริญเกือบ 60 วัน การเจริญของราจะช้าลง เนื่องจากสารอาหารในก้อนเพาะเลี้ยงหมด และค่อยๆ ตายไปทีละส่วน อย่างไรก็ตาม ขณะที่การเจริญของจุลินทรีย์เป็นการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำ ซึ่งจะต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารเหลวเก่าออกแล้วทดแทนด้วยอาหารเพาะเลี้ยงใหม่โดยเฉลี่ยทุก 14 วัน ซึ่งหลังจากการเปลี่ยนถ่ายสารอาหารนี้ ส่งให้ความสมดุลของการเคลื่อนไหลของอิเล็กตรอนและโปรตอนในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพเปลี่ยนแปลงอย่างกระทันหัน ซึ่งเป็นผลจากการลดลงของจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ การลดลงของสารอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอไลท์ของจุลินทรีย์ ถึงแม้ว่าการเจริญของราขาวยังคงเกิดขึ้นอย่างปกติก็ตาม ปรากฏการณ์นี้ มีผลทำให้แรงดันไฟฟ้าของระบบลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ค่า Current density, Voltage density และ Power density ลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม หลังการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่เป็นระยะเวลา 2 วัน ระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพเริ่มเข้าสู่ระยะสมดุลอีกครั้ง ซึ่งปรากฏให้เห็นได้ค่อนข้างชัดเจนในการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำในครั้งที่ 2 ถึง 4



รูปที่ 16 ค่าการเปลี่ยนแปลง Current Density ในเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode

6. สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองทั้งหมด ยืนยันความเป็นไปได้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode โดยการเจริญของราขาวในสภาวะ Solid state ได้ แต่ระบบยังคงให้ประสิทธิภาพของการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพยังคงต่ำมาก และมีข้อจำกัดสูง โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงราขาวในถังแคโทด ซึ่งยังไม่สมบูรณ์เพียงพอที่จะชักนำให้เกิดการเกิดดอกของเส้นใยรา และที่สำคัญที่สุด คือ การเกิดการปนเปื้อนของราดำ หรือราเขียวระหว่างการเลี้ยงราขาวสูงมาก เป็นเหตุให้การเจริญของราขาวถูกยับยั้งหรือยุติหลายครั้งมาก ดังนั้นหากพิจารณาในการนำไปใช้ประโยชน์จริงต้องพัฒนาระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพให้มีขนาดของถัง biocathode ใหญ่เพียงพอที่จะบรรจุสารอาหารสำหรับการเจริญจนกระทั่งเข้าสู่ระยะการเกิดดอกของราขาว นอกจากนี้ ต้องพัฒนาหรือสรรหานวตกรรมที่สูงขึ้นเพื่อส่งเสริมให้การเคลื่อนไหลของอิเล็กตรอนและโปรตอนระบบให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Bruce E. Logan. (2009). Exoelectrogenic Bacteria That Power Microbial Fuel Cells. *Nature review/Microbiology*. 7: 375-381.

Brucee Logan; และคนอื่น ๆ. (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environmental Science & Technology*. 40(17): 5181-5192.

Cao Xiaoxin; และคนอื่น ๆ. (2008). Electricity Generation by an Enriched Phototrophic Consortium in a Microbial Fuel Cell. *Electrochemistry Communications*. 10(9): 1392-1395.

Catal T.; และคนอื่น ๆ. (2008b). Electricity Production from Polyalcohols in Single-Chamber Microbial Fuel Cells. *Biosens. Bioelectron.* 24: 855-860.

Davila D.; และคนอื่น ๆ. (2008). Development and Optimization of Microbial Fuel Cells. *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*. 11(2): 99-103.

Diver S. . (2001). *Nature Farming and Effective Microorganisms, Rhizosphere Ii.* Publications, Resource Lists and Web Links from Steve Diver.

Goldemberg J. . (2007). Ethanol for a Sustainable Energy Future. *Science*. 315: 808-810.

Greenman J.; และคนอื่น ๆ. (2009). Electricity from Landfill Leachate Using Microbial Fuel Cells: Comparison with a Biological Aerated Filter. *Enzyme Microb. Technol.* 44: 112-119.

He Z. L.; และคนอื่น ๆ. (2008). Development and Application of Functional Gene Arrays for Microbial Community Analysis. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 18(6): 1319-1327.

Higa T (1996). Effective Microorganism Microorganisms -Their Role in Kyusei Nature Farming and Sustainable Agriculture. *In Proceedings of the Third International Conference on Kyusei Nature Farming. Ed. Parr JF, Hornick SB, Simpson ME, USDA, Washington, USA*. 20-24.

Higa Teruo; และ Parr F. James. (1994). *Beneficial and Effective Microorganisms for a Sustainable Agriculture and Environment* International Nature Farming Research Center, Atami, Japan.

Hosseini Mir Ghasem; และ Ahadzadeh Iraj. (2013). Electrochemical Impedance Study on Methyl Orange and Methyl Red as Power Enhancing Electron Mediators in

Glucose Fed Microbial Fuel Cell. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 44(4): 617-621.

Katuri Krishna P.; และคนอื่น ๆ. (2011). Microbial Fuel Cells Meet with External Resistance. *Bioresource Technology*. 102(3): 2758-2766.

Lee Dae-Young; และคนอื่น ๆ. (2008). Development and Application of an Oligonucleotide Microarray and Real-Time Quantitative Pcr for Detection of Wastewater Bacterial Pathogens. *Science of The Total Environment*. 398(13): 203-211.

Levin DB.; และคนอื่น ๆ. (2006). Hydrogen Production by *Clostridium Thermocellum* 27405 from Cellulosic Biomass Substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*. 31: 1496-1503.

Liu Hong; Ramnarayanan Ramanathan; และ Logan Bruce E. (2004). Production of Electricity During Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell. *Environmental Science & Technology*. 38(7): 2281-2285.

Logan B.E.; และคนอื่น ๆ. (2007). Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air-Cathode Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* . 41: 3341-3346.

Luo Y.; และคนอื่น ๆ. (2010). Power Generation from Furfural Using the Microbial Fuel Cell. *J. Power Sources*. 195: 190-194.

Manohar A.K.; และ Mansfeld F. (2009). The Internal Resistance of a Microbial Fuel Cell and Its Dependence on Cell Design and Operating Conditions. *Electrochem. Acta*. 54: 1664-1670.

Min Booki; และ Logan Bruce E. (2004). Continuous Electricity Generation from Domestic Wastewater and Organic Substrates in a Flat Plate Microbial Fuel Cell. *Environmental Science & Technology*. 38(21): 5809-5814.

Mohan Y.; Kumar S. M. M.; และ Das D. . (2008). Electricity Generation Using Microbial Fuel Cells. *Int. J. Hydrogen Energ.* 33: 423-426.

Mohd Mustafa Al Bakri Abdullah; และคนอื่น ๆ. (2011). Production of Effective Microorganism Using *Halal*based Sources: A Review. *African Journal of Biotechnology*. 10(81): 18649-18652.

Office of Learning Development and Academic Services Valaya Alongkorn Rajabhat University Under The Royal Patronage. (2010). *Manual of Community Product for Sufficiency Economy.* Phra Nakhon Sri Ayutthaya Tienwattanaprinting co.,ltd.

Oh SangEun; Min Booki; และ Logan Bruce E. (2004). Cathode Performance as a Factor in Electricity Generation in Microbial Fuel Cells. *Environmental Science & Technology*. 38(18): 4900-4904.

Pant Deepak; และคนอื่น ๆ. (2010). A Review of the Substrates Used in Microbial Fuel Cells (Mfcs) for Sustainable Energy Production. *Bioresource Technology*. 101(6): 1533-1543.

Pham; และคนอื่น ๆ. (2004). Improvement of Cathode Reaction of a Mediatorless Microbial Fuel Cell. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14(2): 324-329.

Rabaey Korneel; และ Verstraete Willy. (2005). Microbial Fuel Cells: Novel Biotechnology for Energy Generation. *Trends in Biotechnology*. 23(6): 291-298.

Rahimnejad M.; และคนอื่น ๆ. (2011). Methylene Blue as Electron Promoters in Microbial Fuel Cell. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36(20): 13335-13341.

Rezaei F.; และคนอื่น ๆ. (2009b). Simultaneous Cellulose Degradation and Electricity Production by *Enterobacter Cloacae* in a Microbial Fuel Cell. *Appl. Environ. Microbiol*. 75 (11): 3673-3678.

Sang-Eun Oh; และ Logan Bruce E. (2006). Proton Exchange Membrane and Electrode Surface Areas as Factors That Affect Power Generation in Microbial Fuel Cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 70: 162-169.

Saratale G.; และ Oh S. . (2011). Production of Thermotolerant and Alkalotolerant Cellulolytic Enzymes by Isolated *Nocardiopsis* Sp. Knu. *Biodegradation* 22: 905-919.

Scott K.; และคนอื่น ๆ. (2007). Application of Modified Carbon Anodes in Microbial Fuel Cells. *Process Safety and Environmental Protection*. 85(5): 481-488.

Sharma Suresh K; และ Bulchandani B. D. (2012). Comparative Study of Various Substrates and Microorganisms in a Laboratory Designed Microbial Fuel Cell. *International Journal of Research in Chemistry and Environment* 2(3): 168-174.

Somogyi A.M. (1952). Note on Sugar Determinations. *Journal of Biological Chemistry*. 195: 19-23.

Sukkasem Chontisa; และคนอื่น ๆ. (2011). Upflow Bio-Filter Circuit (Ubfc): Biocatalyst Microbial Fuel Cell (Mfc) Configuration and Application to Biodesel Wastewater ATreatment *Bioresource Technology*. 102: 10363-10370.

Veeranjaneya Reddy L. ; Pradeep Kumar S. ; และ Wee Young-Jung. (2010). Microbial Fuel Cells (Mfcs) - a Novel Source of Energy for New Millennium. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*.

Von Canstein H.; และคนอื่น ๆ. (2008). Secretion of Flavins by *Shewanella* Species and Their Role in Extracellular Electron Transfer. *Applied and Environmental Microbiology*. 615-623.

Wang Chin-Tsan; Chen Wei-Jung; และ Huang Ruei-Yao. (2010). Influence of Growth Curve Phase on Electricity Performance of Microbial Fuel Cell by *Escherichia Coli. International Journal of Hydrogen Energy*. 35(13): 7217-7223.

สารบัญ

เนื้อหา

บทคัดย่อ 4

Abstract 5

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา 6

2. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง 8

3. วัตถุประสงค์ 15

4. วิธีทดลอง 16

4.1 อิทธิพลของชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบและความชื้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ 16

4.2 การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อการเจริญของราขาว 18

4.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเจริญของเชื้อราขาว 18

4.4 การผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 20

4.5 เทคนิคการวิเคราะห์ 22

5. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 24

5.1 อิทธิพลของชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบและความชื้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ 24

5.2 ผลประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 35

6. สรุปผลการทดลอง 42

เอกสารอ้างอิง 43

สารบัญรูป

รูปที่ 1 หลักการพื้นฐานของระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 9
รูปที่ 2 A. เห็ดขอนขาว และ B. เห็ดนางรมภูฐาน 17
รูปที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ Lignin peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 27
รูปที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ Lignin peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อ เห็ดนางรมภูฐาน (PP),อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 28
รูปที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 29
รูปที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0 (R1K0), 1:1 (R1K1) และ 0:1(R0K1) 30
รูปที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ Laccase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 31
รูปที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ Laccase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1 32
รูปที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM), ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 33
รูปที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1) 34
รูปที่ 11 การเจริญของจุลินทรีย์ในถังแอโนดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 36
รูปที่ 12 ค่าการเปลี่ยนแปลง Voltage density และ Current density ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 37
รูปที่ 13 ค่าการเปลี่ยนแปลง Power Density ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ 38
รูปที่ 14 การเจริญของจุลินทรีย์ในถังแอโนดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพในระบบ Biocathode 39
รูปที่ 15 ค่าการเปลี่ยนแปลง Voltage และ Power Density ในเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode 40
รูปที่ 16 ค่าการเปลี่ยนแปลง Current Density ในเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode 41

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของวัสดุทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ 7
ตารางที่ 2 สับเสรตและชนิดจุลินทรีย์ที่แตกต่างที่ใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าจากเซลล์ 14
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidase, Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ที่ผลิตขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ด ที่ระยะเวลาการเจริญ 42 วัน 26

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: สัญญาเลขที่ TRG5780228

ชื่อโครงการ: การผลิตกระแสไฟฟ้าของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพที่เลี้ยงเชื้อราขาวในขั้วคาโทดและจุลินทรีย์อีเอ็มชนิดสารเร่ง พด. 2 ของประเทศไทยในขั้วอาโนด

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ดร.ณัฐต์ณิชา สุขเกษม

วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

อีเมล์: jewy.ja@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: ระยะเวลา 2 ปี (2557 – 2559)

บทคัดย่อ:

นวตกรรมเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อประเมินความเป็นไปได้ของการผลิตกระแสไฟฟ้าควบคู่กับการเจริญของราขาวและจุลินทรีย์ปุ๋ยน้ำชีวภาพของประเทศไทยในการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราขาว บ่งชี้ว่า การเจริญของราขาวจากเห็ดนางรมภูฐานบนวัสดุเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมระหว่างฟางข้าวและแกลบที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่ค่าความชื้นของวัสดุเพาะเลี้ยงระหว่าง 70 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase, laccase, lignin peroxidase และ catalase สูงสุดที่ 0.055, 0.055, 0.059 และ0.052 U/ml ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้มีค่าสูงกว่าที่ได้จากราขาวของเห็ดขอนขาว ทั้งนี้ สารเมตาบอไลท์ที่เกิดขึ้นระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เหล่าในการเจริญของราขาวจะทำหน้าที่ในการเป็นสารให้ประจุบวกหรือโปรตรอนอื่น ๆ ที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพแบบเอซ ด้วยระบบจุลชีววิทยาของขั้วแคโทดโดยมีจุลินทรีย์ปุ๋ยน้ำชีวภาพได้ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำจำนวน 4 ครั้งเป็นระยเวลา 65 วัน ภายในถังแอโนดในสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งการเจริญของจุลินทรีย์ปุ๋ยน้ำชีวภาพนี้จะทำหน้าที่ในการผลิตอิเล็กตรอน ระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพนี้ ให้ค่าความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า ค่าความหนาแน่นความต่างศักย์ และค่าประสิทธิภาพกำลังไฟฟ้าที่ 327 $\mu Amp/cm^2$, 32.77 mV/cm^2 และ 29.55 $\mu W/cm^2$ ตามลำดับ

คำหลัก : จุลินทรีย์ปุ๋ยน้ำชีวภาพ ราขาว จุลชีววิทยาขั้วแคโทด เซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

Abstract

Project Code: TRG5780228

Project Title: Electricity production using microbial fuel cell system culturing white fungi in cathode and EM microorganism PD2 of Thailand under anode

Investigator: Dr.Natthanicha Sukasem . School of Renewable Energy, Maejo University, Chiang Mai

E-mail Address: jewy.ja@gmail.com

Project Period: 2 years (2014 – 2016)

Abstract:

Microbial fuel cell Innovation was applied for evaluation on electricity production couple the growths of white fungi and Thailand biofertilizer microorganism. In the isolation of optimized conditions for the growth of white fungi, it was indicated that the culturation of white rod fungi from *Pleurotus pulmonarius* fungi on mixtures of culture material between rice straw and rice husk at ratio 1:1 at humidity in range between 70 to 75% showed the highest enzyme activities of manganese peroxidase, laccase, lignin peroxidase and catalase at 0.055, 0.055, 0.059 and 0.052 U/ml, respectively. Moreover, these enzyme activities were higher than the activities from *Lentinus squarrosulas* Mont fungi. Therefore, the metabolite chemicals occurred during these enzyme activities for growth of white fungi were acted as donors for positive charge chemicals or other protons that increased the efficiency of electricity production by microbiol fuel cell system type H by using biological cathode. During this step, the biofertilizer microorganism was cultured by using repeated batch system for 4 times within 65 days under anaerobic condition. These microbial growths generated the electron. This microbial fuel cell system showed the current density, voltage density, and power density at values of 327 μAmp/cm^2, 32.77 mV/cm^2 and 29.55 μW/cm^2, respectively.

Keywords: Biofertilizer microorganism White fungi Biological cathode Microbial fuel cell

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

กระบวนการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลเชื้อเพลิงจุลชีพด้วยระบบ Biological cathode กำลังได้รับการศึกษาวิจัยเพิ่มสูงขึ้น เพื่อค้นหาและศึกษาประสิทธิภาพของสารชีวภาพที่สามารถนำมาใช้เป็นสารรับอิเล็กตรอน เช่น เอนไซม์กลุ่ม lignocelluloses เอนไซม์ laccase ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย หรือ รา เช่น ในงานวิจัยของ Gelo-Pujic *et al*., 1999 ที่ศึกษาการใช้เอนไซม์ laccase ที่ผลิตจาก *Pichia pastoris* เพื่อวิเคราะห์ระบบ Electrochemical ในการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพแบบ Biological cathode MFU เป็นต้น

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ 4 ชนิด คือ เอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidas, Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ที่ผลิตขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงราขาว 2 ชนิด ได้แก่ เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulas* Mont.) และเห็ดนางรมภูฐาน (*Pleurotus pulmonarius*) ซึ่งเป็นเห็ดที่ชอบอากาศร้อนชื้น เพาะเลี้ยงได้ง่าย และเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมในการบริโภค โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงราขาว ได้แก่ แกลบ และฟางข้าว ที่เป็นวัสดุทางการเกษตร และถูกนำมาศึกษาเพื่อทดแทนหรือเป็นวัสดุเสริมในผลิตก้อนเชื้อเห็ดต่างๆ รวมทั้งเห็ดขอนขาวและเห็ดรางรมภูฐาน ร่วมกับวัสดุหลัก คือ ขี้เลื่อยไม้ยางพารา โดยมุ่งให้เกิดการลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากในปัจจุบัน ขี้เลื่อยไม้ยางพารามีความต้องการในธุรกิจการเพาะเลี้ยงเห็ดเชิงเศรษฐกิจในปริมาณค่อนข้างสูง และมีราคาแพง ในระหว่างการเจริญของราขาวโดยใช้แกลบ และฟางข้าว หรือแม้กระทั่งวัสดุทางการเกษตรอื่นๆ จะเกิดกระบวนการย่อยสลายสารองค์ประกอบกลุ่ม Lignocelluloses โดยเอนไซม์กลุ่ม ligninolytic enzymes หลายชนิดทำงานร่วมกันในการย่อยสลายสารองค์ประกอบในแกลบและฟางข้าว เช่น Cellulose, hemicelluloses และ lignin เป็นต้น ซึ่งปริมาณสารองค์ประกอบได้มีรายงานวิจัยศึกษาและวิเคราะห์ปริมาณสารองค์ประกอบในวัสดุทางการเกษตรต่างๆ ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของวัสดุทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ

Agricultural	Cellulose	Hemicelluloses	Lignin	Others
Bagasse	44	23	20	13
Corncon	34.1	42.5	12.8	10.6
Peanut shell	22.1	12.1	35.2	30.6
Rice hull	49.1	9.6	12.9	28.4
Rice straw	33	26	7	34
Sugarcane leaf and stalk	40	29	13	18
Sorghum leaf and stalk	31	30	11	28

การวิเคราะห์การผลิตและกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidas, Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ด ณ สภาวะที่ศึกษาต่างๆ กัน จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพแบบ Biological Cathode หรือ Biocathode ร่วมกับการผลิตจุลินทรีย์ พด. 2 ในถังแอโนด

2. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

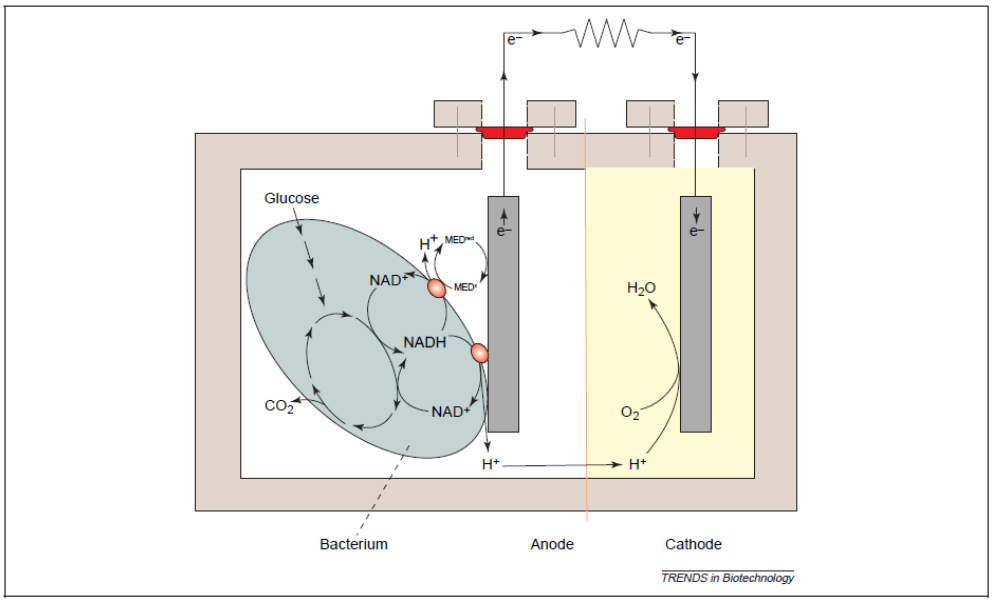
2.1 หลักการพื้นฐานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

เทคโนโลยีเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ เป็นนวัตกรรมเทคโนโลยีใหม่ในการผลิตกระแสไฟฟ้าจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่มีการส่งผ่านของอิเล็กตรอนภายนอกเซลสู่สภาวะแวดล้อม ซึ่งกลไกนี้จะแตกต่างกับเซลล์เชื้อเพลิงหรือแบตเตอร์รี่ในอดีต ด้วยการเปลี่ยนพลังงานเคมีจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ให้เป็นพลังงานไฟฟ้า (Cao Xiaoxin; และคนอื่น ๆ. 2008:) ด้วยปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี (รูปที่ 1) ทั้งนี้ กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพจะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

กระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ไปยังขั้วแอโนด มี 2 กระบวนการ คือ

(1) การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนทางอ้อม (indirect transfer system) ซึ่งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนนี้อาศัยสารตัวกลางที่เรียกว่าสารสื่อนำอิเล็กตรอน (electron mediators หรือ shuttles) สารสื่อนำอิเล็กตรอนนี้ควรมีค่า potential ที่เท่ากับหรือต่ำกว่า -300mV (Rabaey Korneel; และVerstraete Willy. 2005). สารสื่อนำอิเล็กตรอนที่นิยมใช้ได้แก่ methylene blue, neutral red (Davila D.; และคนอื่น ๆ 2008), quinines, cytochromes, flavin mononucleotide และ (ribo) flavin (Von Canstein H.; และคนอื่น ๆ 2008)

(2) การเคลื่อนย้านอิเล็กตรอนโดยตรง (Direct electron transfer) ซึ่งการส่งผ่านอิเล็กตรอนจะเกิดที่ผิวหน้าของเซลล์จุลินทรีย์ (Cell surface) ผ่านระบบช่องส่งผ่านอิเล็กตรอน (Electronic nanowire) (Scott K.; และคนอื่น ๆ 2007:)



รูปที่ 1 หลักการพื้นฐานของระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

นอกจากนี้โปรตอนในระบบถังแอโนดจะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเมมเบรนคัดเลือกไปยังถังคาโทด ซึ่งในระบบถังคาโทด อิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่จากระบบถังแอโนดมาสู่ถังคาโทด จะรวมตัวกับโปรตอนและออกซิเจนในระบบถังแคโทดจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์ สารออกซิไดเซอร์เช่น ferricyanide or Mn(IV) สามารถที่จะถูกนำมาใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนที่ออกซิเจนได้ (Brucee Logan; และคนอื่น ๆ. 2006:) ในขณะเดียวกันนี้ขั้วแอโนดและขั้วคาโทดซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยสายไฟ ทำให้ระบบการผลิตไฟฟ้าเกิดขึ้นครบวงจรจากความต่างศักย์ที่แตกต่างกันระหว่างระบบถังแอโนดและถังคาโทด

2.2 ปัจจัยที่มีต่อประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ ได้แก่

(1) อัตราการเปลี่ยนสับเสตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ (Substrate conversion rate) ขึ้นกับจำนวนของจุลินทรีย์ การผสมและการเคลื่อนย้านสารอาหาร(Mass transfer)ในระบบถังผลิต จลนพลศาสตร์การเจริญของจุลินทรีย์ (microbial kinetics) อัตราการให้สารอาหาร (g substrate per g biomass present per day), และประสิทธิภาพของการแลกเปลี่ยนประจุของเยื่อเมมเบรนเลือกผ่านของประจุบวก (proton exchange membrane) และความต่างศักย์รวมของระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

(2) ค่า Overpotential ของขั้วแอโนด ขึ้นกับพื้นที่ผิวหน้าของขั้วแอโนด คุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมีของขั้วอิเล็คโทรด ความต่างศักย์ของขั้วอิเล็คโทรด กลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอนของสารสื่อนำอิเล็กตรอน (Mediator) และค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

คุณสมบัติที่ดีของสารสื่อนำอิเล็กตรอน ประกอบด้วย (1) สามารถแทรกหรือผ่านเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ได้ (2) สามารถแยกจากเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ได้มี (3) มีประสิทธิภาพสูงในการรับอิเล็กตรอนจากเซลล์จุลินทรีย์ (4) มีประสิทธิภาพสูงในการปล่อยผ่านหรือส่งผ่านอิเล็กตรอนจากสารสื่อนำอิเล็กตรอนไปยังขั้วอิเล็คโทรด (5) ละลายน้ำได้ดีและมีความเสถียรสูง และ (6) ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์และสิ่งแวดล้อม (Mohan Y.;Kumar S. M. M.; และ Das D. . 2008;Wang Chin-Tsan;Chen Wei-Jung; และHuang Ruei-Yao. 2010:).

(3) ค่า Overpotential ของขั้วคาโทด ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นรีดักชั่นของสารรับอิเล็กตรอน เช่น ออกซิเจน กับโปรตอนเพื่อเกิดน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งการเกิดปฏิกิริยานี้ มักจะเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ดังนั้น ในบางระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ เพื่อป้องกันการสูญเสียความ Overpotential จึงมีการเติมสารออกซิไดเซอร์ เช่น hexacyanoferrate ดังนั้น เพื่อให้ค่า Overpotential ของขั้วคาโทดมีความเสถียร ขั้วแคโทดควรเป็นระบบเปิด (open-air cathodes) (Pham; และคนอื่น ๆ. 2004;Min Booki; และLogan Bruce E. 2004;Oh SangEun;Min Booki; และLogan Bruce E. 2004:)

(4) ศักยภาพของเยื่อเลือกผ่านโปรตอนเมมเบรน (proton exchange membrane; PEM) เยื่อเลือกผ่านโปรตอน (PEM) มีหลายชนิด ได้แก่ Nafion, Ultrex และ carbon paper(Liu Hong;Ramnarayanan Ramanathan; และLogan Bruce E. 2004:) เป็นต้น ทั้งนี้ Ultrex เป็นเยื่อเลือกผ่านโปรตอนเมมเบรนที่มีประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนโปรตอนสูงที่สุด

(5) ความต้านทานภายในของระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ ขึ้นกับค่าความต้านทานของขั้วอิเล็คโทรดและเยื่อเลือกผ่านโปรตอนเมมเบรน ดังนั้น ในทางปฏิบัติเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าสูงที่สุด ขั้วแคโทดและขั้วแอโนดควรถูกวางในตำแหน่งที่ใกล้กันมากที่สุด

(6) ค่า Overpotential ของขั้วแอโนด ขึ้นกับพื้นที่ผิวหน้าของขั้วแอโนด คุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมีของขั้วอิเล็คโทรด ความต่างศักย์ของขั้วอิเล็คโทรด กลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอนของสารสื่อนำอิเล็กตรอน (Mediator) และค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

คุณสมบัติที่ดีของสารสื่อนำอิเล็กตรอน ประกอบด้วย (1) สามารถแทรกหรือผ่านเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ได้ (2) สามารถแยกจากเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ได้มี (3) มีประสิทธิภาพสูงในการรับอิเล็กตรอนจากเซลล์จุลินทรีย์ (4) มีประสิทธิภาพสูงในการปล่อยผ่านหรือส่งผ่านอิเล็กตรอนจากสารสื่อนำอิเล็กตรอนไปยังขั้วอิเล็คโทรด (5) ละลายน้ำได้ดีและมีความเสถียรสูง และ (6) ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์และสิ่งแวดล้อม (Mohan Y.;Kumar S. M. M.; และDas D. . 2008;Wang Chin-Tsan;Chen Wei-Jung; และHuang Ruei-Yao. 2010:).

2.3 สารสื่อนำอิเล็กตรอนกับการพัฒนาการประสิทธิภาพระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

เนื่องจากสารสื่อนำอิเล็กตรอน (Mediator) เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าจากเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ ในแง่ของ ค่า Overpotential ของขั้วแอโนด การคัดเลือกของชนิดสารสื่อนำอิเล็กตรอนที่เหมาะสมต่อกลุ่มจุลินทรีย์หรือจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตกระแสไฟฟ้าจากเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพจึงมีความสำคัญอย่างมาก จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา ได้มีรายงานวิจัยอิทธิพลของเมทธิลลีนบลูที่ค่าความเข้มข้นจาก 50, 100, 200, 300, และ 400 ไมโครโมลาร์ ที่มีต่อการผลิตกระแสไฟฟ้าจาก *S.cerevisiae* ได้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่ 12.3 โมโครวัตต์ และปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ 232 ไมโครแอมป์ที่ความเข้มข้นของเมธทิลลีนบลู 300 มิลลิโวลต์ (Rahimnejad M.; และคนอื่น ๆ. 2011:) ในขณะที่เมธทิลลีนบลูที่ความเข้มข้น 50 100, 200, และ 400 ไมโครโมลาร์ ได้ค่ากระแสไฟฟ้าต่ำกว่าที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ ผลวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของเมธทิลีนบลูมีผลโดยตรงต่อการชักนำการเกิดกระแสไฟฟ้าและประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้า

นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาผลของการใช้เมธทิลออร์เร้ท์น(Methyl orange) และเมธทิลเรด (Methyl red) เป็นสารสื่อนำอิเล็กตรอนในการผลิตกระแสไฟฟ้าจาก activated sludge โดยใช้กลูเป็นแหล่งคาร์บอน (Hosseini Mir Ghasem; และAhadzadeh Iraj. 2013:) ปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ผลิตได้ (1) 106 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร (2) 164 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร และ (3) 207 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร เมื่อ (1) ไม่มีการเติมสารสื่อนำอิเล็กตรอน (2) เมื่อเติมเมทธิลออร์เร้นท์ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ (3) เมื่อเติมเมทธิลเรดความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ การเติมสารสื่อนำอิเล็กตรอนจะเพิ่มค่าระบบ open circuit potential ให้สูงขึ้น และไปลดค่าความต้านทานการเคลื่อนที่ของประจุส่งผลให้การเคลื่อนที่ของประจุลบหรืออิเล็กตรอนที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์เคลื่อนที่ไปสู่ขั้วแอโนดได้มากขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

2.4 กลุ่มจุลินทรีย์อีเอ็มและกลุ่ม พด

เทคโนโลยีจุลินทรีย์อีเอ็ม หรือ Effective microorganism (EM) ค้นพบโดยศาสตรจารย์ ดอกเตอร์เทรุโอะ ฮิกะ ในปี 1980 (Higa Teruo; และParr F. James. 1994:) การผลิตจุลินทรีย์อีเอ็มเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ณ อุณหภูมิห้อง เทคโนโลยีจุลินทรีย์อีเอ็มเกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ การประยุกต์ใช้ การจัดการ และการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้แก่สิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นการเพิ่มความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการพัฒนาคุณภาพของดิน และคุณภาพของพืชเกษตรกรรมในแง่ของการเจริญของพืชและปริมาณผลผลิต นอกจากนี้ จุลินทรีย์อีเอ็มสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช การจัดการน้ำเสียหรือน้ำทิ้ง เป็นต้น (Higa T 1996:)

จุลินทรีย์อีเอ็มประกอบไปด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ธรรมชาติที่มีประโยชน์มากกว่า 80 ชนิด(Mohd Mustafa Al Bakri Abdullah; และคนอื่น ๆ. 2011:) และเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมและเป็นจุลินทรีย์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ (1) กลุ่มจุลินทรีย์ผู้ผลิต (positive (regeneration) (2) กลุ่มจุลินทรีย์ผู้ย่อยสลาย negative (decomposition) และ (3) กลุ่มจุลินทรีย์ฉวยโอกาส (Opportunists microorganism) ตัวอย่างของกลุ่มจุลินทรีย์อีเอ็ม เช่น Photosynthetic bacteria (*Rhodopseudomonas palustris* และ *Rhodobacter spaeroides*) lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei* และ *Streptoccus lactis*), yeast (*Saccharomyces* cerevisiae and *Candida utilis*), actinomyces (*Streptomyces albus* and *Streptomyces griseus*), fermenting fungi (*Aspergillus oryzae, Penicillium* sp และ *Mucor hiemalis*) (Diver S. . 2001:) และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus* sp.

2.5 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์อีเอ็มในเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา ได้กล่าวถึงการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ *S. cerevisiae*, *Bacillus sp* และ photosynthetic bacteria ในการผลิตกระแสไฟฟ้าจากเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพในระบบ two-compartment MFC (Sharma Suresh K; และBulchandani B. D. 2012:) ที่ประกอบด้วยขั้วแอโนดและคาโทดจากแผ่นนิกเกิ้ลขนาด 15 x 1 เซ็นติเมตร ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ในสาระลายลเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นสะพานเกลือ ระบบถังคาโทดประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และใช้เมธทิลลีน บลูเป็นสารสื่อนำอิเล็กตรอน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์) ผลการวิจัยพบว่า *B. subtilis* สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าที่ (1) 2.14 mA และ 1.07 mW/cm^3, (2) 1.01 mA และ 0.52 mW/cm^3 และ (3)

0.70 mA และ 0.38 mW/cm^3 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และแป้งเป็นสับสเตรตตามลำดับ ทั้งนี้ ค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จาก *B. subtilis* มีค่าสูงกว่าจาก *S.cerevisiae* ซึ่งมีค่ากระแสไฟฟ้า (1) 0.65 mA และ 0.37 mW/cm^3, (2) 0.64 mA และ 0.32 mW/cm^3, และ (3) 0.24 mA และ 0.17 mW/cm^3 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และแป้งเป็นสับสเตรตตามลำดับ ด้วยเหตุที่จุลินทรีย์ พด ประกอบด้วย *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus* sp. และ photosynthetic bacteria นั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำจุลินทรีย์อีเอ็มมาประยุกต์ใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ ทั้งนี้ผลการวิจัยเบื้องต้น ได้ยืนยันว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ โดยใช้แท่งถ่านคาร์บอน (Carbon brush) เป็นขั้วแอโนดและคาโทด และมีเมธทิลลีนบลูที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ เป็นสารสื่อนำอิเล็กตรอน ดังนั้น ระบบการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพในกระบวนการผลิตจุลินทรีย์อีเอ็ม จึงเรียกระบบนี้ว่า EM-MFC (Effective Microorganism – Microbial fuel cell)

ผลการวิจัยเบื้องต้น เป็นการใช้กลุ่มจุลินทรีย์อีเอ็มที่เป็นระบบเชื้อผสม (Mix culture) เป็นแหล่งผู้ผลิตกระแสไฟฟ้าจากระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ ซึ่งให้ประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าใกล้เคียงกับรายงานการวิจัยในอดีต (ตารางที่ 1) ที่มีทั้งการใช้กลุ่มจุลินทรีย์หรือเชื้อผสม และจุลินทรีย์สายพันธ์บริสุทธ์ (pure culture) ซึ่งยืนยันได้ว่าการใช้จุลินทรีย์หลายชนิดพร้อมกันในกลุ่มจุลินทรีย์เชื้อผสมที่มีกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ที่แตกต่างขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ ไม่ส่งผลต่อกระบวนการและประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

ตารางที่ 2 สับเสรตและชนิดจุลินทรีย์ที่แตกต่างที่ใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าจากเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

ชนิดของสารอาหาร	ความเข้มข้น	ชนิดจุลินทรีย์	ชนิดของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ (electrode surface area and/or cell volume)	Current density (mA/cm^2) ณ maximum power	เอกสารอ้างอิง
Acetate	1 g/L	Pre-acclimated bacteria from MFC	Cube shaped one-chamber MFC with graphite fiber brush anode (7170 m^2/m^3 brush volume)	0.8	(Logan B.E.; และคนอื่น ๆ. 2007:)
Arabitol	1220 mg/L	Pre-acclimated bacteria from MFC	One-chamber air-cathode MFC (12 mL) with non wet proofed carbon cloth as anode (2 cm^2) and wet proofed carbon cloth as cathode (7 cm^2)	0.68	(Catal T.; และคนอื่น ๆ. 2008b:)
Cellulose particles	4 g/L	Pure culture of *Enterobacter cloacae*	U-tube MFC with carbon cloth anode (1.13 cm2) and carbon fibers as cathode	0.02	(Rezaei F.; และคนอื่น ๆ. 2009b:)
Furfural	6.8 mM	Pre-acclimated bacteria from MFC	One-chamber air-cathode MFC with carbon paper anode and cathode (7 cm^2)	0.17	(Luo Y.; และคนอื่น ๆ. 2010:)
Galactitol	1220 mg/L	Pre-acclimated bacteria from MFC	One-chamber air-cathode MFC (12 mL) with non wet proofed carbon cloth as anode (2 cm^2) and wet proofed carbon cloth as cathode (7 cm^2)	0.78	(Catal T.; และคนอื่น ๆ. 2008b:)
Glucose	6.7 mM	Mixed bacterial culture maintained on sodium acetate for 1	One-chamber air-cathode MFC (12 mL) with non wet proofed carbon cloth as anode (2 cm^2) and wet proofed carbon cloth as cathode (7 cm^2)	0.70	(Catal T.; และคนอื่น ๆ. 2008b:)

ชนิดของสารอาหาร	ความเข้มข้น	ชนิดจุลินทรีย์	ชนิดของเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ (electrode surface area and/or cell volume)	Current density (mA/cm^2) ณ maximum power	เอกสารอ้างอิง
		year (*Rhodococcus* and *Paracoccus*)			
Glucuronic acid	6.7 mM	Mixed bacterial culture	One-chamber air-cathode MFC (12 mL) with non wet proofed carbon cloth as anode (2 cm2) and wet proofed carbon cloth as cathode (7 cm^2)	1.18	(Catal T.; และคนอื่น ๆ. 2008b:)
Lactate	18 mM	Pure culture of *S. oneidensis* MR-1	Two-chambered MFC with graphite felt electrode (20 cm^2)	0.005	(Manohar A.K.; และMansfeld F. 2009:)
Landfill leachate	6000 mg/L	Leachate and sludge	Two-chambered MFC with carbon veil electrode (30 cm^2)	0.0004	(Greenman J.; และคนอื่น ๆ. 2009:)

(Pant Deepak; และคนอื่น ๆ. 2010:)

3. วัตถุประสงค์

(1) เพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบ และความชื้น ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidas, Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ระหว่างการเจริญของราขาว

(2) เพื่อประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพร่วมระหว่างการเจริญของราขาวและจุลินทรีย์กลุ่ม พด

4. วิธีทดลอง

4.1 อิทธิพลของชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบและความชื้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์

4.1.1 การเตรียมวัตถุดิบและหัวเชื้อ

(1) วัตถุดิบในการทดสอง ได้แก่ ฟางข้าว และแกลบ

การเตรียมฟางข้าว นำฟางข้าวที่แห้งและสะอาด ปราศจาการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ มาทำการตัดให้เป็นเส้นสั้นๆ ความยาว 1 เซนติเมตร จากนั้น นำมาเก็บในที่แห้ง เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

(2) การเตรียมแกลบ

แกลบที่นำมาใช้ต้องแห้ง สะอาด ปราศปราศจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เช่น ราดำ และไม่มีแมลง เช่น มอด ซึ่งจะก่อให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อราขาวได้

(3) ชนิดของราขาว ได้แก่ เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulas* Mont.) และเห็ดนางรมภูฐาน (*Pleurotus pulmonarius***)**

4.1.2 การเตรียมหัวเชื้อราขาว เห็ดขอนขาว และเห็ดนางรมภูฐาน ในข้าวฟ่างแดง

หัวเชื้อราขาว เห็ดขอนขาว และเห็ดนางรมภูฐาน ในข้าวฟ่างแดง สั่งซื้อมาจากชมรมเกษตรปลอดสารพิษ สำนักงานใหญ่ ทั้งนี้ ในการขยายหัวเชื้อราขาว จะทำการเลี้ยงบนข้าวฟ่างแดง ซึ่งเตรียมได้โดยนำข้าวฟ่างแดง ชนิดแห้งจำนวน 2 กิโลกรัม มาทำการคัดเลือกเมล็ดข้าวที่เสียทิ้ง ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำก๊อก 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าจะสะอาด จากนั้น นำเมล็ดข้าวฟ่างแดง ที่ล้างสะอาดแช่ในน้ำสะอาดเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นทำการล้างให้สะอาดจนกว่าจะหมดกลิ่นเห็นเปรี้ยว และนำมาทำการนึ่งจนกว่าจะสุกนิ่ม จากนั้นนำข้าวฟ่างแดง ที่สุกแล้วมาทำการพึ่งให้เกือบแห้งด้วยอากาศ บรรจุลงขวดสะอาดที่มีฝาปิดสนิทปริมาณ 3 ใน 4 ส่วนของปริมาตรขวด และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ขวดหัวเชื้อเห็ดที่เจริญเต็มที่ในข้าวฟ่างแดง (เส้นใยมีสีขาวสะอาด) นำมาเขย่าขวดเพื่อแยกเส้นใยของเห็ดบนเมล็ดข้าวฟ่างออกจากกัน จากนั้นนำหัวเชื้อเห็ด จำนวน 10 กรัม ใส่ลงในขวดขยายหัวเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และทำการบ่มเส้นใยเห็ดที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน

A. B.

http://www.thaikasetsart.com http://supon.siam2web.com/?cid=1164680

รูปที่ 2 A. เห็ดขอนขาว และ B. เห็ดนางรมภูฐาน

4.1.3 การเตรียมก้อนเชื้อเห็ด นำฟางข้าวและแกลบที่เตรียมแล้วจากข้อ 1 มาผสมรวมกันที่อัตราส่วนฟาง:แกลบ ที่ 1:0, 1:1 และ 0:1 โดยน้ำหนัก จากนั้นทำการผสมสารองค์ประกอบของสูตรอาหาร ดังในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 วัสดุองค์ประกอบต่าง ๆ ในการเตรียมก้อนเชื้อเห็ด

ชนิดของวัตถุดิบ	**ปริมาณที่ใช้ (กรัม)**
วัตถุดิบที่ใช้	1000
รำละเอียด	70
ใบกระถิ่นป่น	70
แป้งข้าวเหนียว	70
ภูไมท์ซัลเฟต	15
แร่มอลท์	15
ดีเกลือ	2
ยิบซั่ม	10
ปูนขาว	10
กากน้ำตาล	100
น้ำกลั่น (ปรับความชื้น)	65 - 75%

นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมให้เข้ากันดี จากนั้นปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 65% 70% และ 75% โดยทำการวัดค่าความชื้นในวัตถุดิบด้วยเครื่องวัดความชื้น (Wood powder Moisture meter) รุ่น TK100W จากนั้นทำการบรรจุลงในถุง (30 กรัม น้ำหนักวัตถุดิบแห้งก่อนปรับความชื้น) ใส่คอขวดและปิดจุกขอขวดให้สนิท จากนั้นนำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำหัวเชื้อเห็ดบริสุทธิ์จำนวน 10 กรัม เติมในถุงก้อนเห็ดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และทำการบ่มเส้นใยเห็ดนางรมภูฐานที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งเส้นใยเจริญเต็มถุง (นาน 30 - 60 วัน ขึ้นกับชนิดของรา)

4.2 การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อการเจริญของราขาว

3.2.1 ด้านสัดส่วนของฟางข้าวและแกลบ: อัตราส่วนโดยน้ำหนักของฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0, 1:1 และ 0:1 ให้ได้น้ำหนักสุดท้าย 30 กรัม (วิธีการเตรียมข้อ 1.6)

4.1 .2 ด้านความชื้นในก้อนเห็ดที่มีต่อการเจริญของราขาว: ที่ 65%, 70% และ 75% (วิธีการเตรียมข้อ 1.6)

4.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเจริญของเชื้อราขาว

การเจริญของราขาวทั้ง 2 ชนิด วัดจากกิจกรรมของเอนไซม์ 4 ชนิด ที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการย่อยสลายวัตถุดิบเพื่อนำไปใช้ในการเจริญ กิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำการศึกษาได้แก่ เอนไซม์ Laccase (E.C. 1.10.3.2), เอนไซม์ Lignin peroxidase (E.C. 1.11.1.14), เอนไซม์ Manganease peroxidase (MnP) (E.C. 1.11.1.13) และเอนไซม์ Catalase (E.C. 1.11.1.6)

4.3.1 การเตรียมตัวอย่างของเชื้อราขาว

นำก้อนเชื้อเห็ดที่มีการเจริญในระยะเวลาต่างๆ ปริมาณ 10 กรัม มาทำการบดแยกเส้นใยราออกจากกัน จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่า pH 6.0 จำนวน 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อแยกสารละลายเอนไซม์ออกจากตะกอน และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase

นำตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 10 mM DMP (2,6-dimetoxiphenol) ในสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate buffer ที่ความเข้มข้น 500 mM ที่ค่า pH 5.0 จากนั้นทำการบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

4.3.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Lignin peroxidas

นำตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมในสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 1 ml ของ 50mM sodium potassium tartarate buffer ที่ค่า pH 4, 0.1 ml ของ H_2O_2, และเติม methylene blue ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 32 uM จากนั้นนำมาทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 650 nm

ค่า% การลดลงของสี methylene blue คำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Decolourization of methylene blues} = \frac{A650\ Control - A650\ Test}{A650\ Control} X100$$

4.3.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Manganease peroxidase (MnP)

1 มิลลิลิตรของสารละลายสับสเตรท ประกอบด้วย 25 mM lactate, 0.1 mM MnSo4, 1 ml BSA, และ ตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 0.5 ml ที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM sodium succinate buffer mที่ค่า ph 4.5 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ MnP เริ่มขึ้นเมื่อทำการเติมด้วยสารละลาย H_2O_2 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mM จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาทีและหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 50 µl และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร ปฏิกิริยาของเอนไซม์คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

Enzyme activity assay = A610 for test assay –A610 for control assay

4.3.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Catalase

เตรียมสารละลายสับสเตรท 1 มิลิลิตร ที่ประกอบด้วย 65 mM H_2O_2 ในสารละลาย sodium phosphate buffer เข้มข้น 60 mM ที่ค่า pH 7.4 จากนั้นทำการเติมตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทำการวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย ammonium molydate ที่ความเข้มข้น 32.4 mM และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

4.4 การผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

ในขั้นตอนนี้ เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในควบคู่กับการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพร่วมระหว่างการเจริญของราขาวและจุลินทรีย์กลุ่ม พด

4.4.1 การผลิตจุลินทรีย์

สำหรับการเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ พด 2 นั้น ทำได้โดยการนำผงหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้ง มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลทรายความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และประกอบด้วย KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และ $(NH4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วย Autoclave จากนั้นนำสารละลายอาหารเหลวดังกล่าวที่ทำการเติมผงหัวเชื้อที่อัตราส่วนความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปเขย่าที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลาประมาณ 1 - 2 ชั่วโมง เพื่อทำการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปแบบผงแห้งเกิดการเจริญ

จากนั้น กล้าเชื้อที่ทำการเตรียมไว้ข้างต้น นำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังแอโนดในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยใช้ปริมาตรอาหารเหลวเพาะเลี้ยงจำนวน 150 มิลลิลิตร และใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยมีการเติมสารสื่อนำอิเล็กตรอน (Mediator) ซึ่งได้แก่ เมทิลลีนบลู ที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิห้องโดยมีค่าอุณหภูมิโดยเฉลี่ยระหว่าง 30 ± 3 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดค่า ^{o}Brix และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จนกระทั่งการเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

4.4.2 การสร้างระบบถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode

ชุดระบบถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพเพื่อการผลิตกระแสไฟฟ้าในการทดลองนี้เป็นชนิด H-type แบบ Biocathode ชุดถังประกอบด้วยถังแอโนดและถังคาโทดที่ผลิตจากถังพลาสติกขนาดเท่ากันที่สามารถบรรจุอาหารเหลวเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในปริมารตร 150 มิลลิลิตรได้อย่างพอดี ถังแอโนดและถังคาโทดเชื่อมต่อกันด้วยเมมเบรนเลือกผ่านชนิด Nefion membrane ขนาดพื้นที่หน้าตัด 3x3 ตารางเซนติเมตร ถังแอโนดจะบรรจุอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สามารถถูกปิดให้สนิท ถังแอโนดจะถูกจะเป็นช่องขนาดเล็กจำนวน 2 ช่อง สำหรับเทอร์โมมิเตอร์และช่องสำหรับการเก็บตัวอย่าง ซึ่งช่องเก็บตัวอย่างจะถูกปิดให้สนิทจนกว่าจะมีการเก็บตัวอย่าง ส่วนถังคาโทดจะเป็นระบบ Biocathode ซึ่งเป็นการใช้ระบบของถังแคโทดโดยมีการใช้สารเมตาบอไลซ์จากการเจริญของสิ่งมีชีวิตใด ๆ เป็นแหล่งรับโปรตอน ทั้งนี้ ในการทดลองนี้ ระบบ Biocathode จะเป็นการเพาะเลี้ยงราขาวด้วยระบบแบบ Solid state ในถัง Biocathode หรือ Cathode โดยบรรจุอาหารก้อนเพาะเลี้ยงราขาวที่ได้จากสภาวะที่ทำการคัดเลือกที่ให้การผลิตเอนไซม์ที่ดีที่สุด ราขาวที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นตอนที่แล้วจะนำมาเป็นหัวเชื้อราขาว ซึ่งหัวเชื้อราขาวนี้ต้องเจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างอย่างสมบูรณ์ โดยจะให้หัวเชื้อราขาวในจำนวน 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยทำการใส่หัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างที่ด้านบนของก้อนอาหารแข็ง ทั้งนี้ด้านบนฝากล่องแคโทดจะเจาะรูขนาดเล็กเพื่อให้เกิดการเคลื่อนที่ผ่านของออกซิเจนได้อย่างดี เพื่อเลียนแบบการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อในสภาวะปกติให้ได้มากที่สุด ขั้วแอโนดทำจากวัสดุคาร์บอนสำหรับทำแปลงถ่าน (carbon brush และขั้วคาโทดทำจากตาข่ายสแตนเลสสตีล) ขั้วแอโนดมีพื้นที่ผิวสัมผัสที่ 2.78 ตารางเซนติเมตร และขั้วคาโทดมีพื้นที่ผิวสัมผัสที่ 1.27 ตารางเซนติเมตร ซึ่งทั้ง 2 ขั้วจะเชื่อมต่อกันด้วยลวดทองแดงที่หุ้มผิวหน้าเส้นลวดด้วยพลาสติกหุ้มสายไฟปกติ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชชั่นของอิเล็กตรอนกับออกซิเจนในอากาศ (Sharma Suresh K; และBulchandani B. D. 2012:) ทั้งนี้ เส้นลวดทองแดงจะมีขนาดและความยาวเท่ากัน เพื่อป้องกันการคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์) เพื่อให้การผลิตกระแสไฟฟ้าจนกระทั่งระบบการผลิตกระแสไฟฟ้าเข้าสู่สภาวะสมบูรณ์ กำหนดความต้านทานภายนอกที่โหลดเข้าสู่ระบบมีค่า 100 โอห์ม อย่างไรก็ตาม ก่อนการดำเนินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพแบบ Biocathode ด้วยการเจริญของราขาวและจุลินทรีย์ พด 2 นั้น จะมีการดำเนินระบบทดสอบโดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พด ภายในถังแอโนด และทำการเติมน้ำกลั่นลงสู่ถังแคโทด เพื่อหาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ตลอดช่วงระยะเวลาการผลิตกระแสไฟฟ้า เพื่อใช้เป็นการทดลองเชิงบวกของการวิจัยนี้ ทั้งนี้เพื่อติดตามการทำงานของระบบ ตัวอย่างที่ทำการเก็บจะถูกนำไปวิเคราะห์หาน้ำตาลทั้งหมดและ ^{o}Brix เพื่อติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของระบบ

จากค่า current, voltages, power, volumetric power, volumetric current, current density และ voltage density

4.5 เทคนิคการวิเคราะห์

การวัดค่า Power และ volumetric power

ระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพนี้จะทำการวัดค่าการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยดิจิตอล มัลติมิเตอร์ ทุก ๆ 24 ชั่วโมง ค่ากำลังไฟฟ้า หรือ Power (*P*) และค่า volumetric power หรือ power density ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ (1) และ (2) (Sang-Eun Oh; และLogan Bruce E. 2006;Sukkasem Chontisa;และคนอื่น ๆ. 2011:)

$$P=V^2/R \quad (1)$$

$$\textit{Volumetric power} = \text{P/anode volume } (m^3) \quad (2)$$

ขณะที่ *V* คือ โวลต์ไฟฟ้า (voltage) และ *R* (Ω) คือค่าความต้านทาน

การวัดค่ากระแสไฟฟ้า Current และ volumetric current

ค่ากระแสไฟฟ้า (Current;*I*) และ volumetric current คำนวณได้จากสมการที่ (3) และ (4) (Sang-Eun Oh; และLogan Bruce E. 2006;Sukkasem Chontisa; และคนอื่น ๆ. 2011:).

$$I=V/R \quad (3)$$

$$\textit{Volumetric current} = I\text{/anode volume } (m^3) \quad (4)$$

การวัดค่าความหนาแน่นของค่ากระแสไฟฟ้าและโวลต์

ค่าความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้า (Current density) และค่าความหนาแน่นของโวลต์ไฟฟ้า (voltage density) คำนวณได้จากสมการที่ (5) และ (6) (Katuri Krishna P.; และคนอื่น ๆ. 2011:).

$$\textit{Current density} = I/m^2 \quad (5)$$

$$\textit{Voltage density} = V/m^2 \quad (6)$$

โดยที่ *I* และ *V* คือ ค่ากระแสไฟฟ้าและโวลต์ไฟฟ้า ตามลำดับ ขณะที่ m^2 คือ พื้นที่ผิวของขั้วแอโนดอิเล็คโทรด

การวัดค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการเจริญจะทำการวัดโดยเทคนิค Phenol sulfuric method โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม จำนวน 1 มิลลิลิตร มาผสมกันอย่างดีกับสารละลาย Phenol ที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นจำนวน 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างดี และทำการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในสารละลายตัวอย่างวิเคราะห์ได้กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่ค่าความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 and 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การวัดค่า °Brix

ค่า °Brix ของตัวอย่างสารละลายจุลินทรีย์วัดด้วย Hand reflectometer

5. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 อิทธิพลของชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบและความชื้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์

ในการศึกษาอิทธิพลของชนิด และสัดส่วนของวัตถุดิบ และความชื้นในก้อนเชื้อเห็ดที่มีการผลิตเอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidas Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ระหว่างการเจริญของราขาวที่อุณหภูมิห้อง 30± 3 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 56 วัน หรือ 8 สัปดาห์ ภายใต้สภาวะการเจริญที่แตกต่างกัน พบว่า

1) ที่ระดับความชื้นในก้อนเชื้อเห็ดที่ระดับเดียวกัน กิจกรรมของเอนไซม์ lignin peroxidase, manganese peroxidase, laccase และ catalase ที่ได้จากการเจริญของเห็ดขอนขาว (LSM) และเห็ดนางรมภูฐาน (PP) มีแนวโน้มไปทางเดียวกันและมีค่าที่ใกล้เคียงกัน โดยปริมาณของเอนไซม์เหล่านี้ จะเริ่มสูงขึ้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และกิจกรรมของเอนไซม์จะเริ่มคงที่เมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะเวลาระหว่างวันที่ 28 – 42 วัน หรือสัปดาห์ที่ 4 – 6 และการเจริญของเห็ดจะเริ่มคง หรือ ลดลง ตั้งแต่วันที่ 42 ของการเจริญเป็นต้นไป

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ระดับความชื้นต่างกัน ตั้งแต่ 65 – 75% เห็ดขอนขาว (LSM) และเห็ดนางรมภูฐาน (PP) มีอัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกัน คือ ที่ความชื้นในก้อนเชื้อเห็ด 70% กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด จะมีค่าสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ ที่ระดับความชื้น 75% และ 65% ตามลำดับ ดังปรากฏในรูปที่ 2 ถึง 9 และตารางที่ 4 ซึ่งที่ระดับความชื้น 70% นี้ ฟางข้าวและแกลบ ซึ่งเป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงสามารถอุ้มน้ำไว้ในตัวเองได้ดี โดยไม่มีน้ำส่วนเกินในก้อนเชื้อเห็ด โดยพบได้ในก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แกลบเป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงเพียงชนิดเดียว ระดับความชื้นในก้อนเชื้อเห็ดที่มากเกินไปหรือน้อยเกินไป ส่งผลให้เส้นใยเจริญได้ช้าหรือหยุดการเจริญของเส้นใยราได้

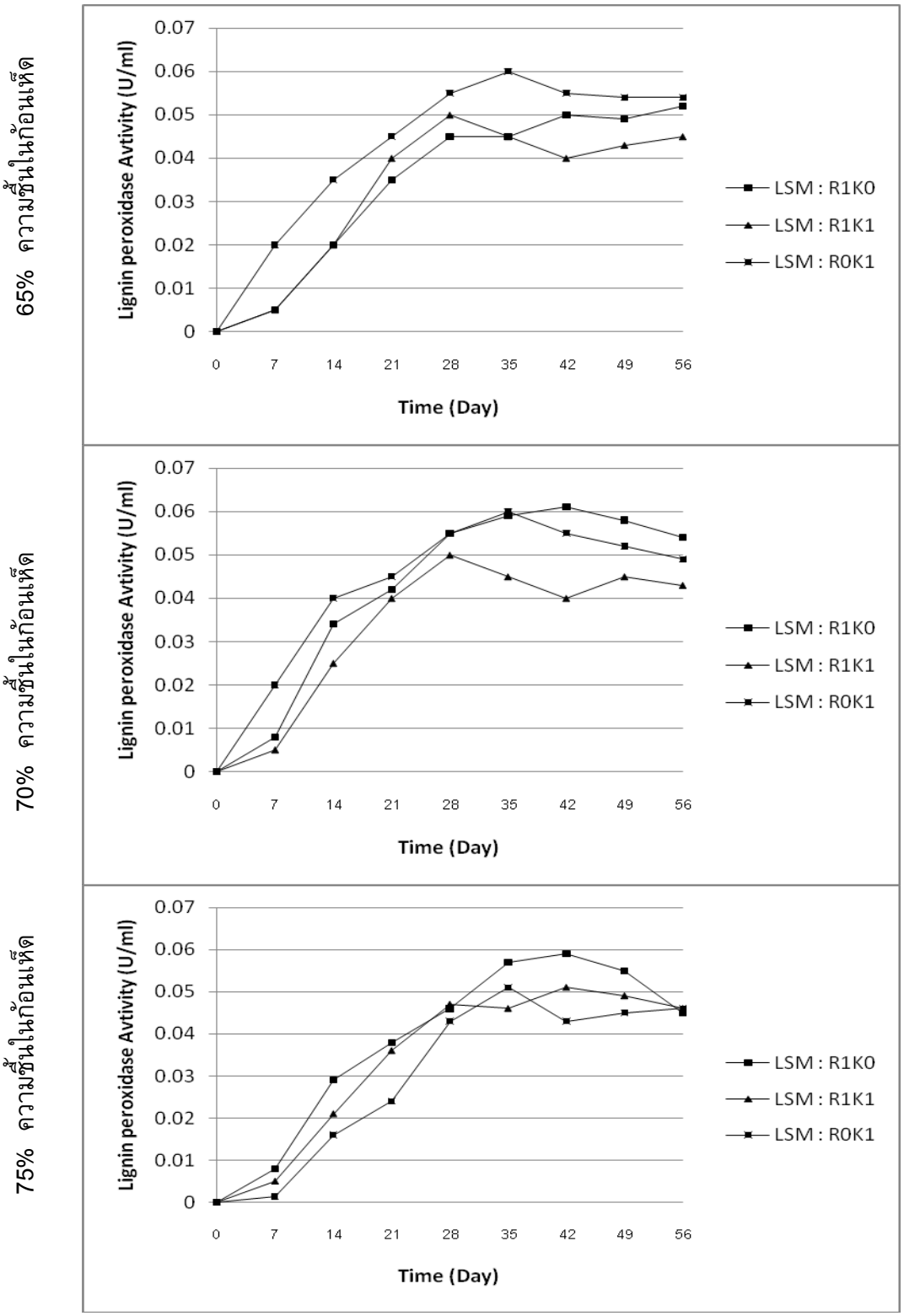
2) ชนิดและสัดส่วนของวัตถุดิบมีผลต่อการเจริญของราทั้ง 2 ชนิด และมีผลต่อการควบคุมหรือการรักษาความชื้นในก้อนเชื้อเห็ด เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุฟางข้าวและแกลบนั้น ฟางจะเก็บและรักษาความชื้นได้ดี อย่างไงก็ตาม เมื่อพิจารณาสัดส่วนอิทธิพลของวัตถุดิบ ณ ที่ระดับค่าความชื้นเดียวกันพบว่า ที่อัตราส่วนของฟางข้าวต่อแกลบที่ 1 : 1 (R1K1) จะมีอัตราการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase, laccase และ catalase ดีที่สุด (รูปที่ 2 ถึง 9 และตารางที่ 4) รองลงมาได้แก่ที่อัตราส่วน ฟางข้าวต่อแกลบที่ 1 : 0 (R1K0) และ ที่ 0:1 (R0K1) ตามลำดับ เนื่องจากการเลี้ยงราขาวโดยใช้แกลบทั้งหมด ความสามารถในการรักษาความชื้นจะมีผลต่อการเจริญ

โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับความชื้น 65 และ 75% ยกเว้นกิจกรรมของเอนไซม์ lignin peroxidase ที่แสดงค่ากิจกรรมสูงที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในวัสดุที่อัตราส่วน ฟางข้าวต่อแกลบที่ 1 : 0 (R1K0)

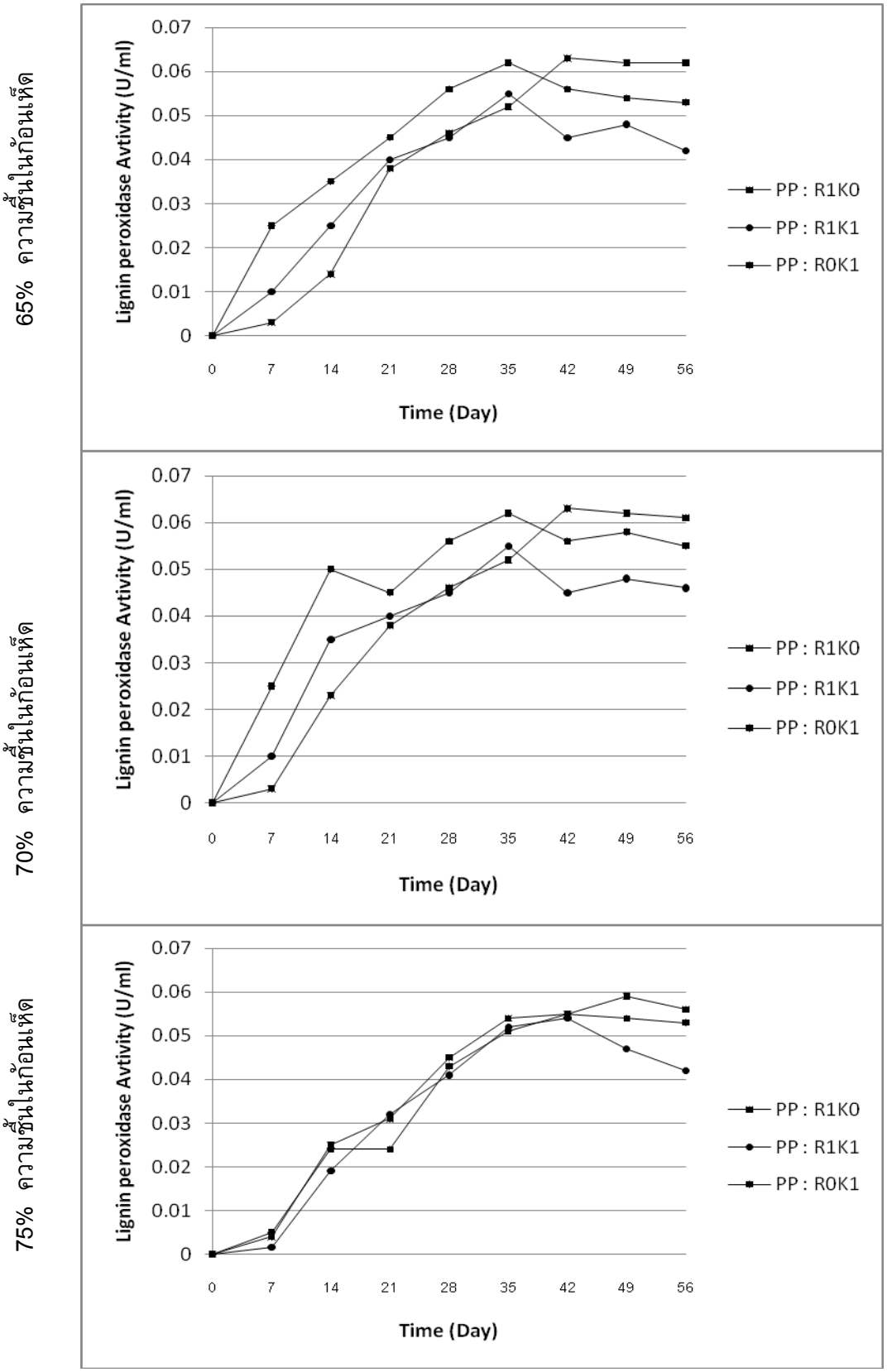
การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ผลิตขึ้นระหว่างการเจริญของเห็ดทั้ง 2 ชนิด ในก้อนเชื้อเห็ด แสดงในตารางที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นจากการทดลอง ซึ่งจะพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละสภาวะการเพาะเลี้ยง มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ช่วงค่าสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์ Manganese peroxidase, laccase, lignin peroxidase และ catalase ของเห็ดขอนขาวและเห็ดนางรมภูฐาน ได้แก่ที่ระดับความชื้นในก้อนเชื้อเห็ดระหว่าง 70-75 % โดยใช้ฟางข้าวและแกลบผสมร่วมกันที่อัตราส่วน 1:1 หรือใช้ฟางข้าวเพียงอย่างเดียวในการเป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงเห็ด เพื่อจะนำไปสู่การศึกษาความสามารถในการออกดอกเห็ด ปริมาณดอกเห็ดที่ได้ และนำไปใช้ในโครงการวิจัยในระยะที่ 2 ต่อไป เพื่อทดสอบหาสภาวะของระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพในการผลิตกระแสไฟฟ้าโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราขาวที่คัดเลือกได้แก่ การเลี้ยงราขาวจากเห็ดนางรมภูฐานในขั้วคาโทดและเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พด.2 ของประเทศไทย ในขั้วอาโนดต่อไป

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ Laccase, Lignin peroxidase, Manganease peroxidase (MnP) และ Catalase ที่ผลิตขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ด ที่ระยะเวลาการเจริญ 42 วัน

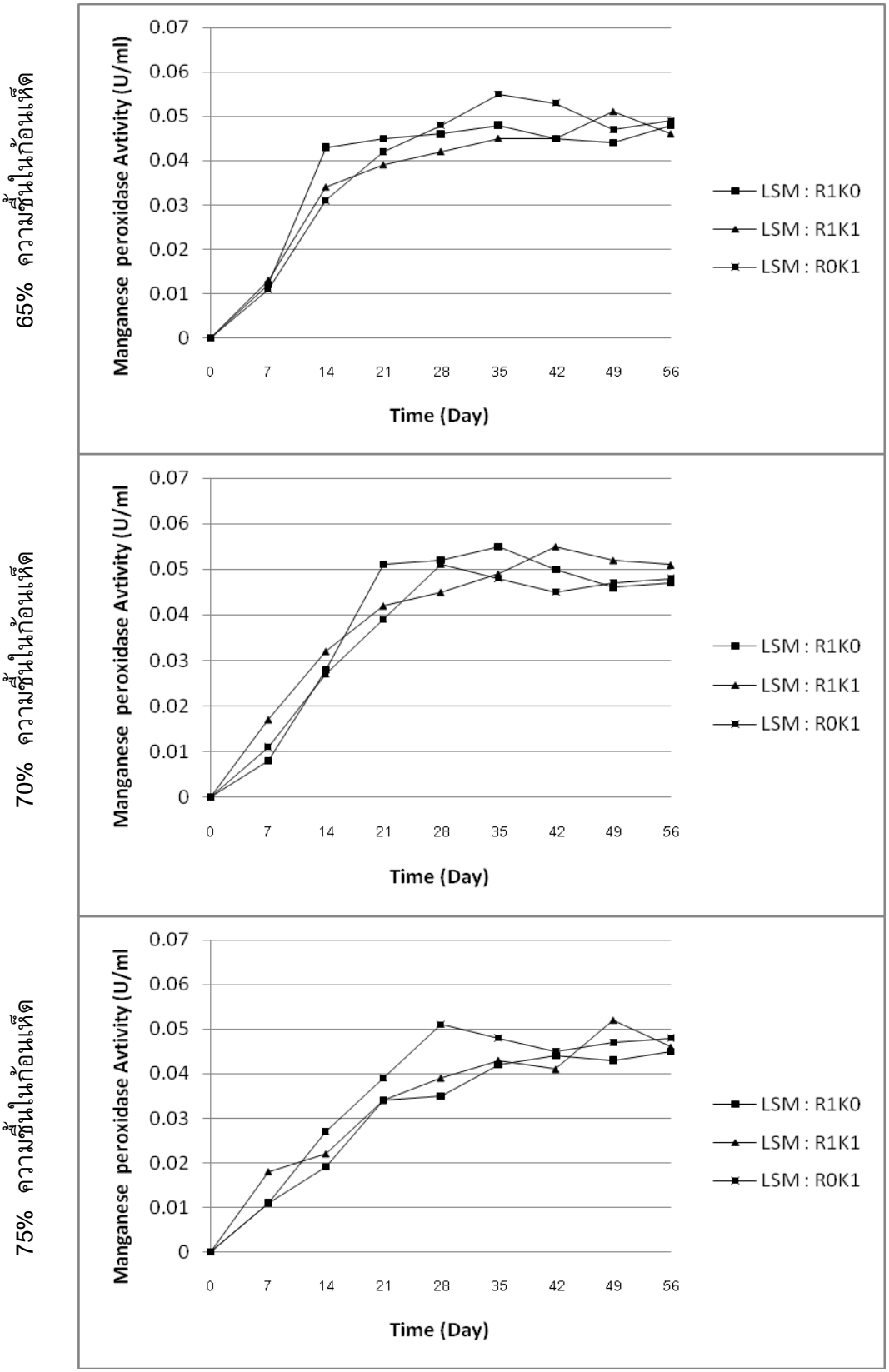
ชนิด	ระดับความชื้นในก้อนเห็ด (%)	อัตราส่วนฟางข้าว: แกลบ	Enzyme activity (U/ml)			
			Laccase	Lignin peroxidase	Manganease peroxidase	Catalase
เห็ดขอนขาว (LSM)	65	1:0(R1K0)	0.042	0.05	0.045	0.039
		1:1(R1K1)	0.046	0.04	0.045	0.046
		0:1(R0K1)	0.042	0.055	0.053	0.037
	70	1:0(R1K0)	0.039	0.061	0.05	0.042
		1:1(R1K1)	0.055	0.04	0.055	0.038
		0:1(R0K1)	0.033	0.055	0.045	0.034
	75	1:0(R1K0)	0.033	0.059	0.044	0.042
		1:1(R1K1)	0.043	0.051	0.041	0.042
		0:1(R0K1)	0.049	0.043	0.045	0.047
ชนิด	**ระดับความชื้นในก้อนเห็ด (%)**	**อัตราส่วนฟางข้าว: แกลบ**	**Enzyme activity (U/ml)**			
			Laccase	**Lignin peroxidase**	**Manganease peroxidase**	**Catalase**
เห็ดนางรมภูฐาน (PP)	65	1:0(R1K0)	0.042	0.063	0.047	0.039
		1:1(R1K1)	0.046	0.045	0.035	0.046
		0:1(R0K1)	0.042	0.056	0.043	0.037
	70	1:0(R1K0)	0.039	0.063	0.047	0.051
		1:1(R1K1)	0.055	0.045	0.059	0.046
		0:1(R0K1)	0.033	0.056	0.059	0.033
	75	1:0(R1K0)	0.051	0.055	0.047	0.051
		1:1(R1K1)	0.046	0.054	0.045	0.052
		0:1(R0K1)	0.051	0.055	0.043	0.043



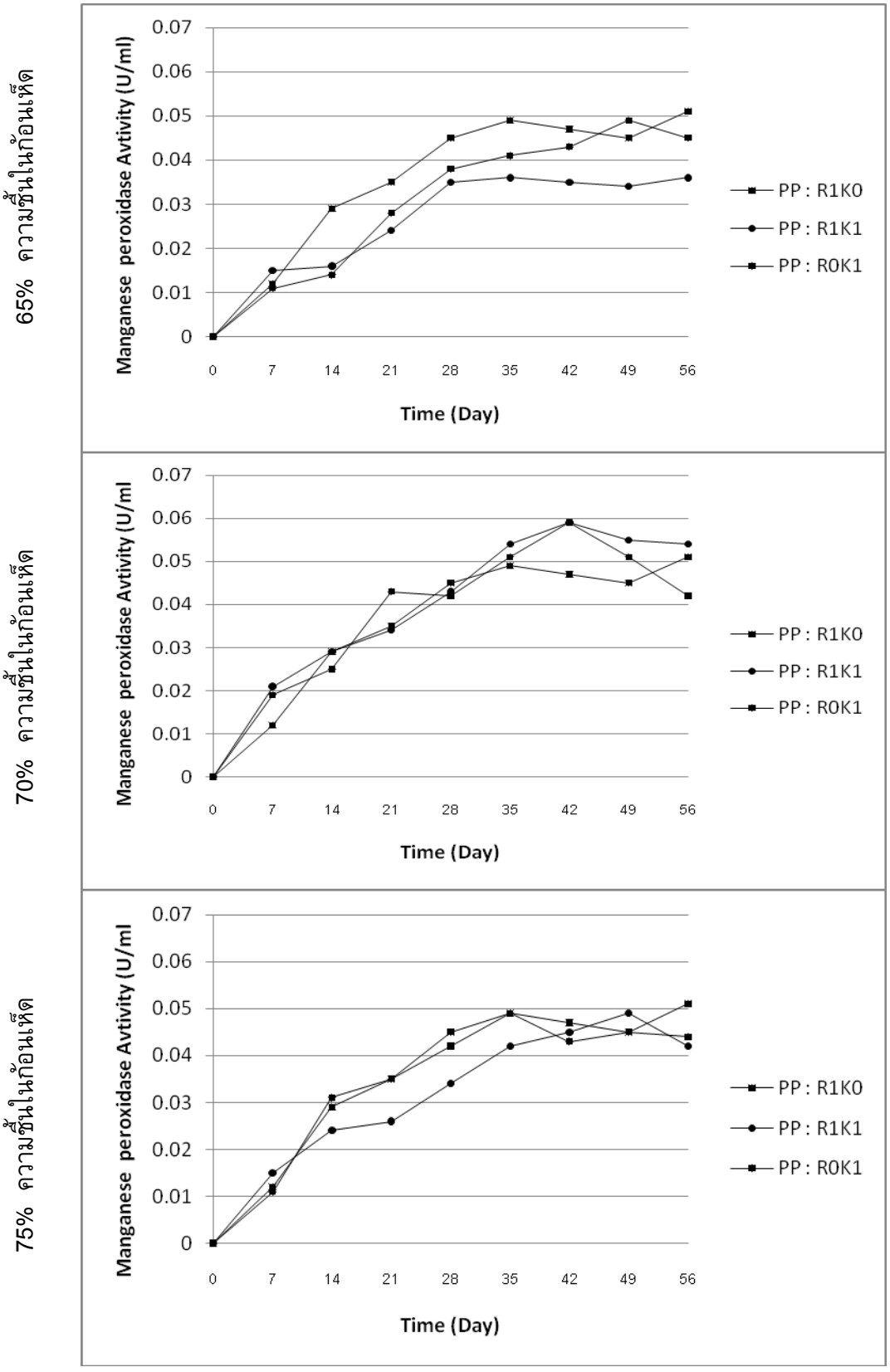
รูปที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ Lignin peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)



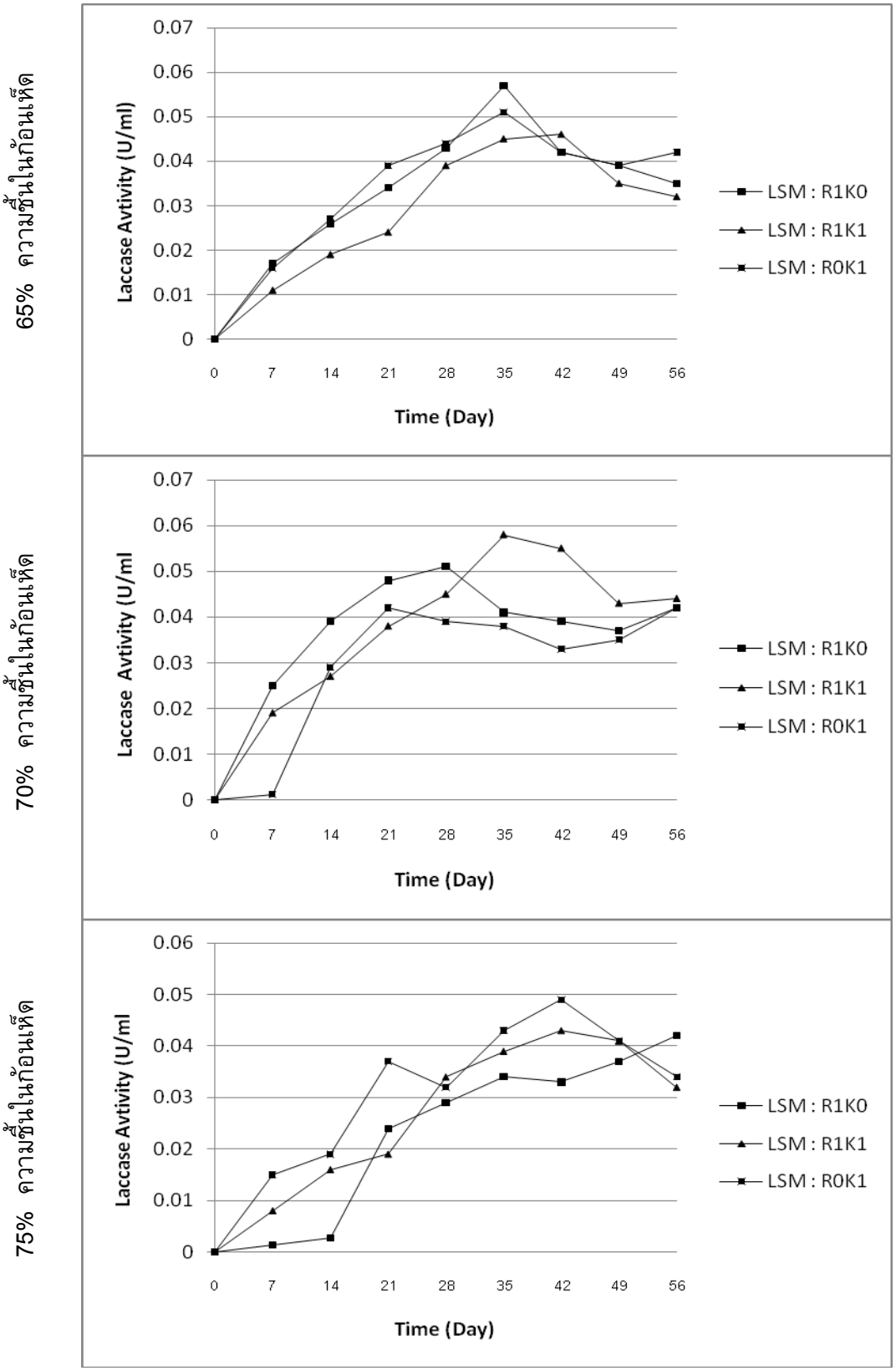
รูปที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ Lignin peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อ เห็ดนางรมภูฐาน (PP),อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)



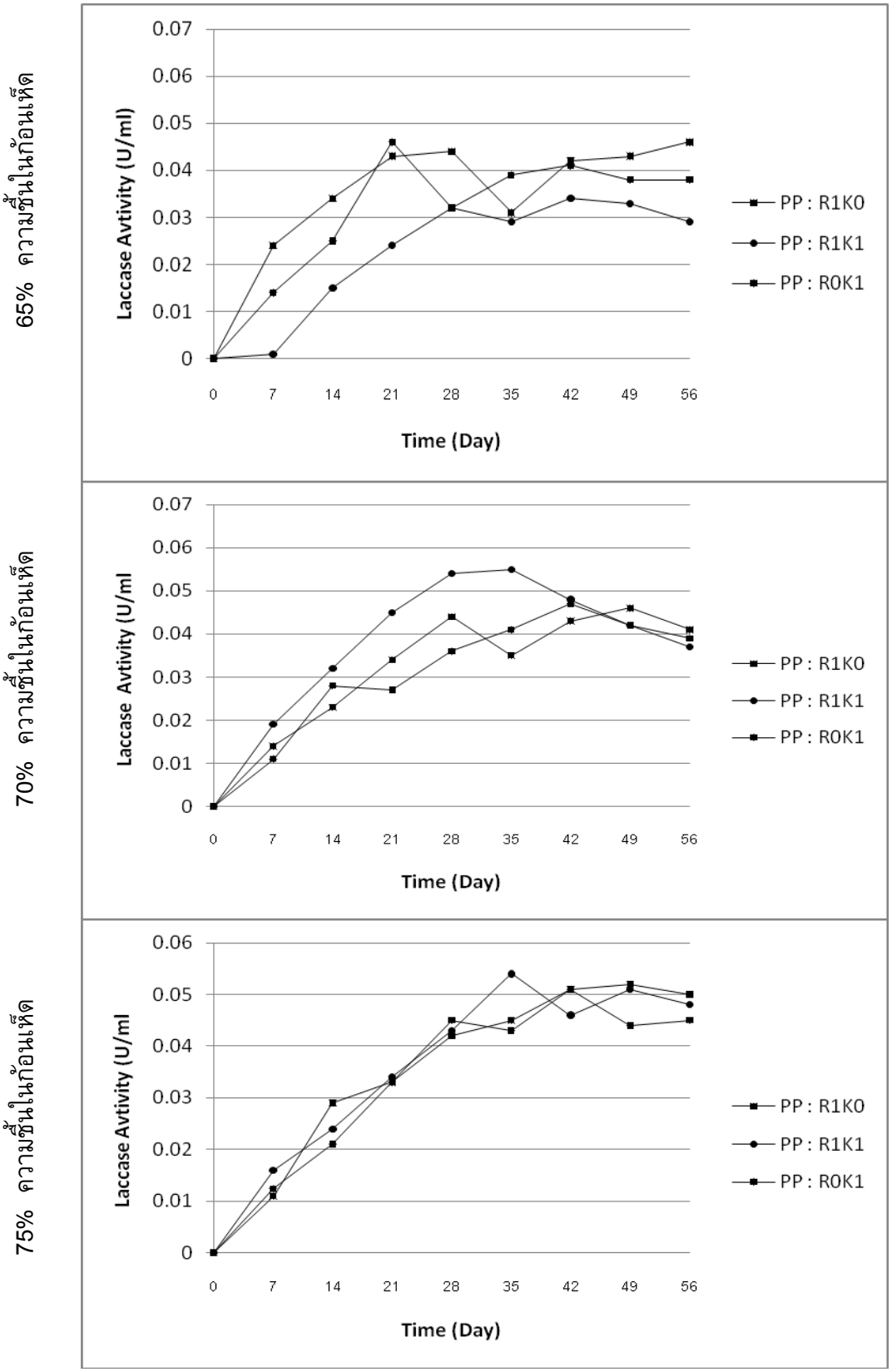
รูปที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)



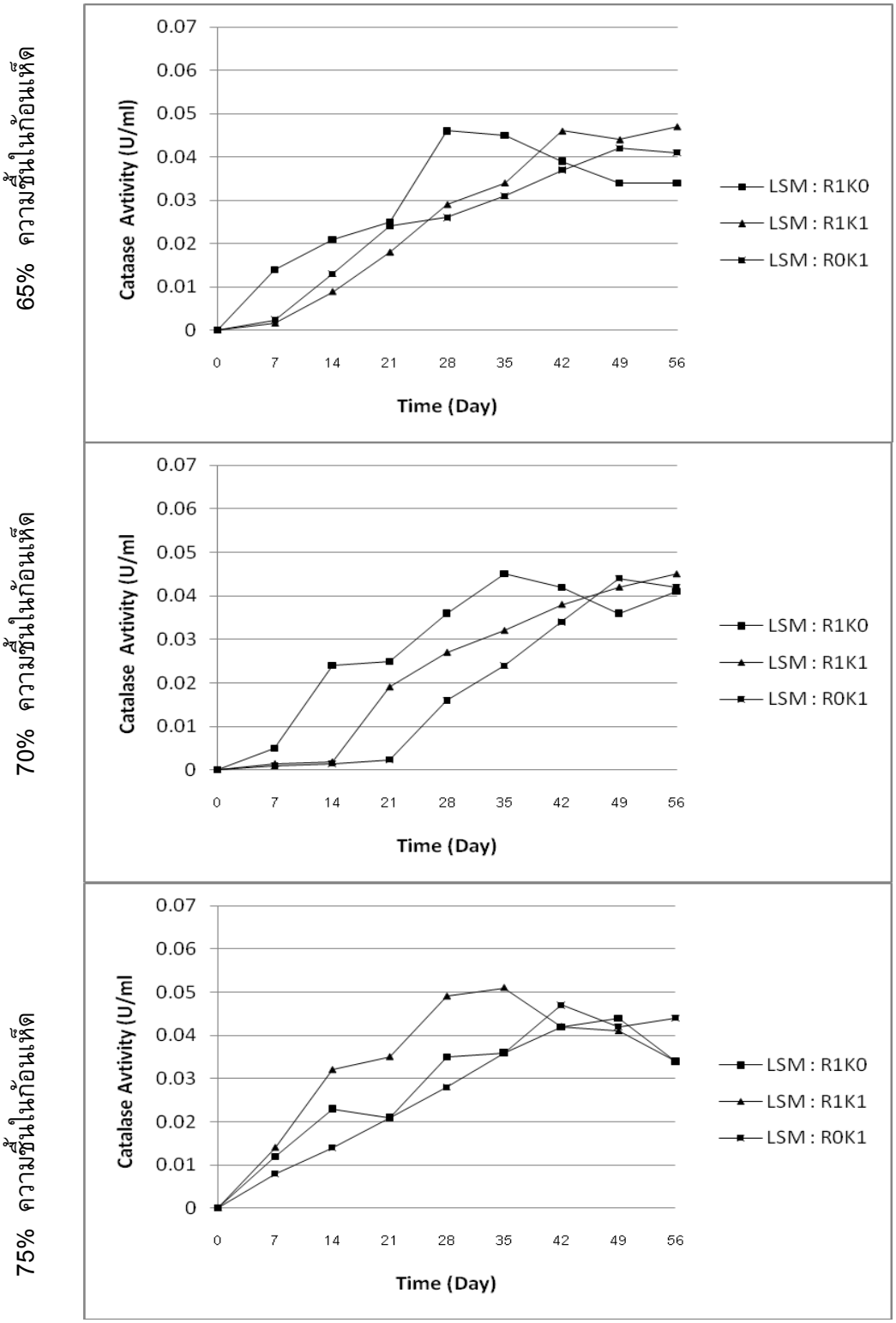
รูปที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0 (R1K0), 1:1 (R1K1) และ 0:1(R0K1)



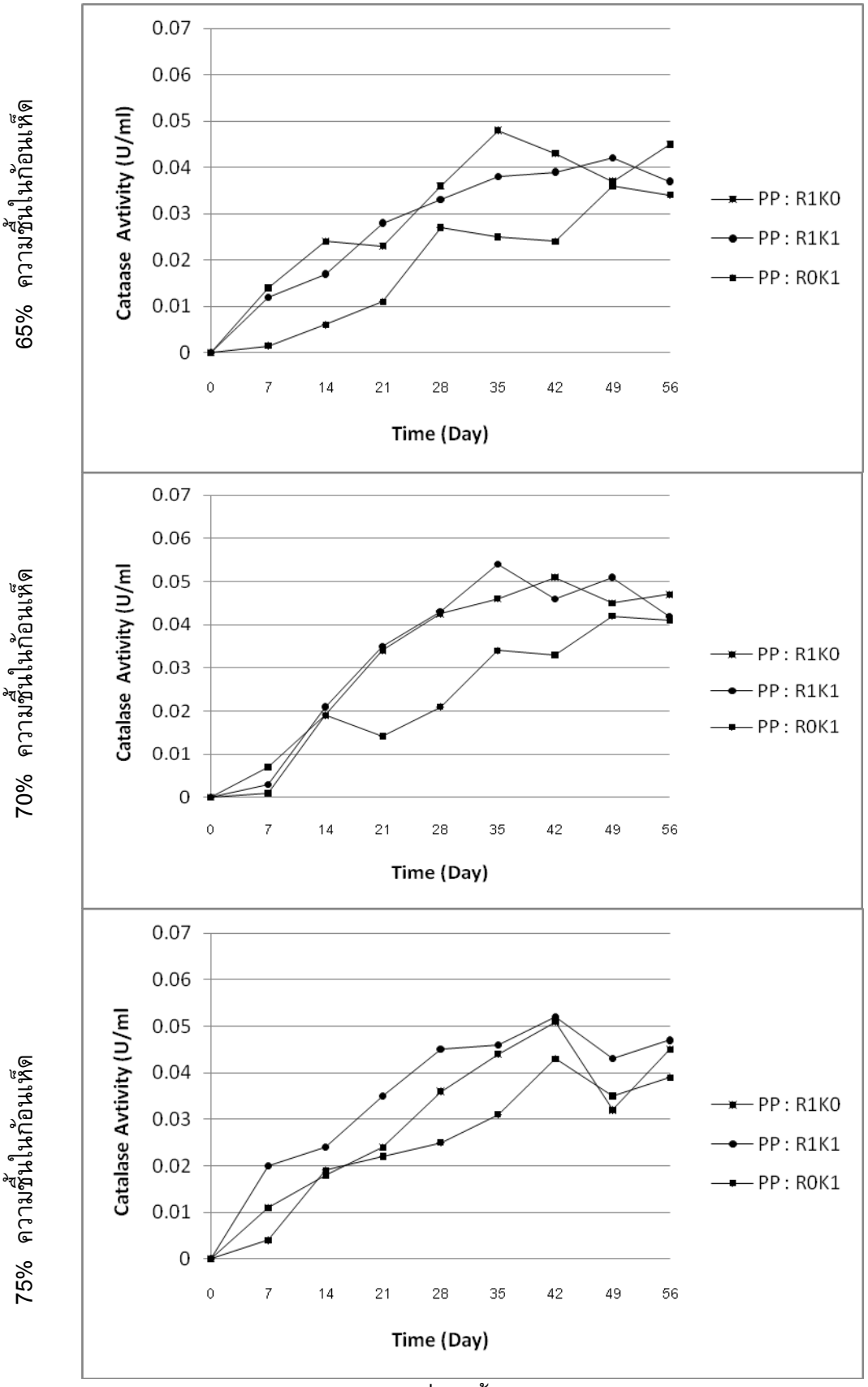
รูปที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ Laccase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)



รูปที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ Laccase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1



รูปที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดขอนขาว (LSM), ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)



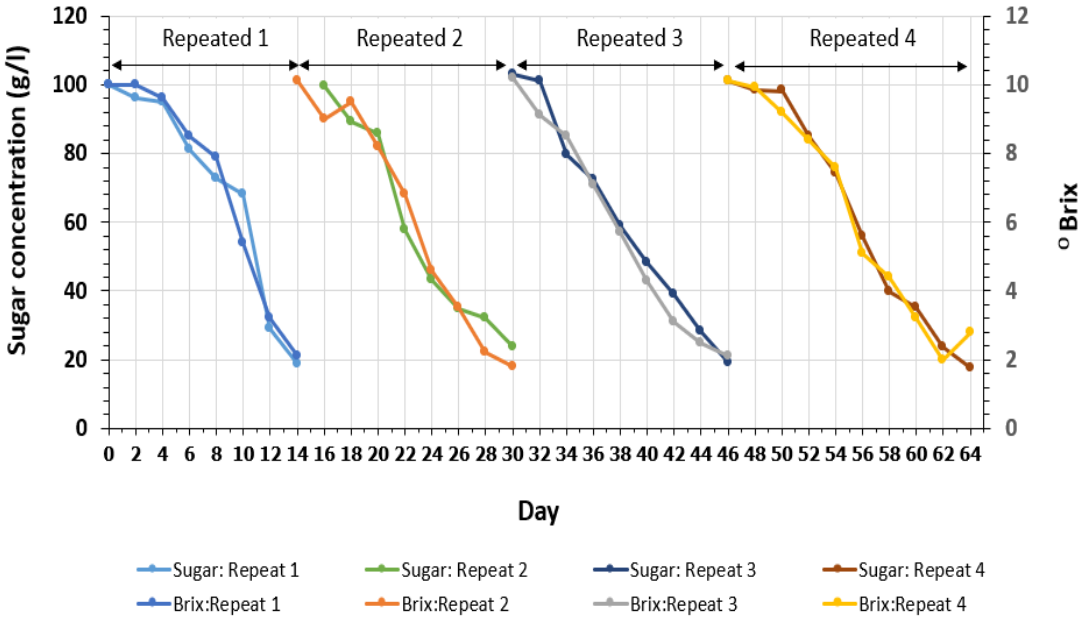
รูปที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (U/ml) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในก้อนเชื้อเห็ดนางรมภูฐาน (PP) ที่อัตราส่วนฟางข้าวต่อแกลบที่ 1:0(R1K0),1:1(R1K1) และ 0:1(R0K1)

5.2 ผลประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

การทดลองในขั้นนี้ เป็นการทดสอบเพื่อประเมินความเป็นไปได้ของการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพด้วยระบบ Biocathode ด้วยการเพาะเลี้ยงราขาวจากเห็ดนางรมภูฐานในระบบการเพาะเลี้ยงแบบ Solid state โดยใช้สภาวะที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ผ่านมา ได้แก่ ทำการเพาะเลี้ยงที่ระดับความชื้นในก้อนเชื้อเห็ดระหว่าง 70-75 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ฟางข้าวและแกลบผสมร่วมกันที่อัตราส่วน 1:1 เป็นส่วนประกอบหลักของก้อนเชื้อหลัก

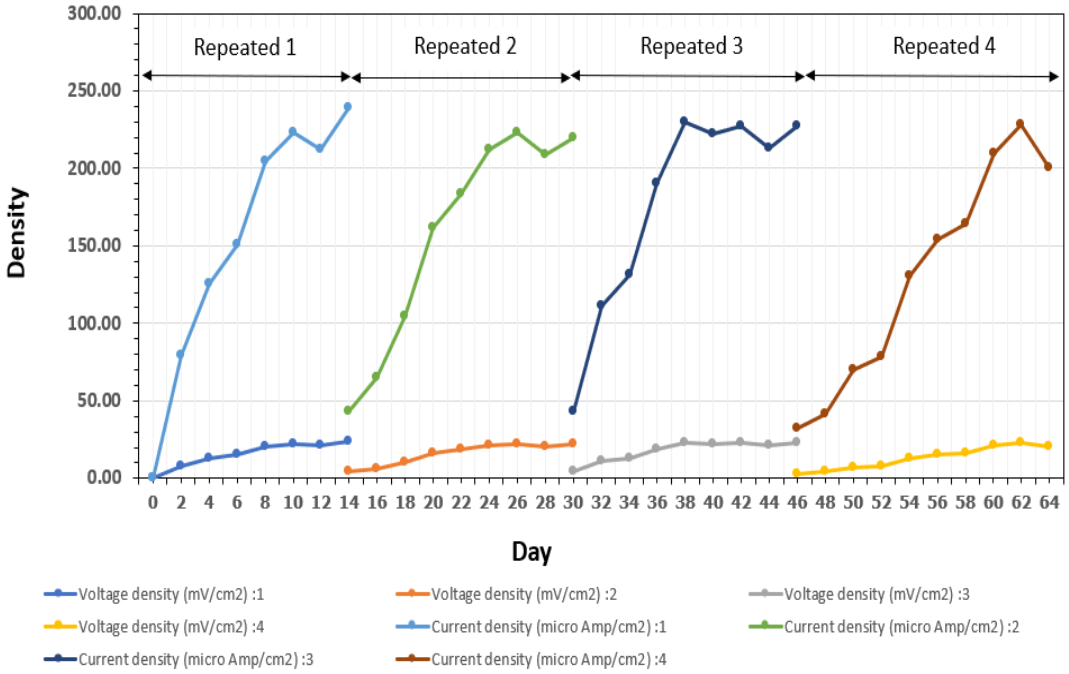
5.2.1 การผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยจุลินทรีย์ พด โดยใช้น้ำเป็นตัวรับโปรตอน

ผลการทดลองนี้ แสดงถึงประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพที่มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ พด 2 ระหว่างการเจริญในถังแอโนด โดยมีน้ำเป็นตัวรับโปรตอนซึ่งถูกบรรจุในถังแคโทด ทั้งนี้ เนื่องจากการเจริญของเชื้อราใช้เวลานานในช่วงระหว่าง 45 วัน ถึง 60 วัน จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พด 2 ถูกทำให้เกิดขึ้นด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำ (Repeated batch) โดยทุกครั้งของการเปลี่ยนถ่ายอาหารเหลวเก่าออกจากระบบและทดแทนด้วยอาหารเหลวใหม่นั้น อาหารเพาะเลี้ยงเก่านั้น คงเหลืออยู่ในระบบประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรของปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมด เพื่อทำหน้าที่เป็นหัวเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบซ้ำในรอบถัดไป ซึ่งจุลินทรีย์จะถูกทำการเพาะเลี้ยงแบบซ้ำทั้งหมด 4 รอบ ในระยะเวลาการผลิตกระแสไฟฟ้าในระบบทั้งหมด 64 วัน ซึ่งได้มีการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของน้ำตาล, ค่า ^{o}Brix, Current density, voltage density และ power density ทั้งนี้กำหนดให้พื้นที่ผิวของขั้วแอโนดเท่ากับ 2.78 ตารางเซนติเมตร และ พื้นที่ผิวของขั้วแคโทดเท่ากับ 2.5 ตารางเซนติเมตร การเปลี่ยนแปลงของค่าความสัมพันธ์ดังกล่าวดังแสดงในรูปต่อไปนี้



รูปที่ 11 การเจริญของจุลินทรีย์ในถังแอโนดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

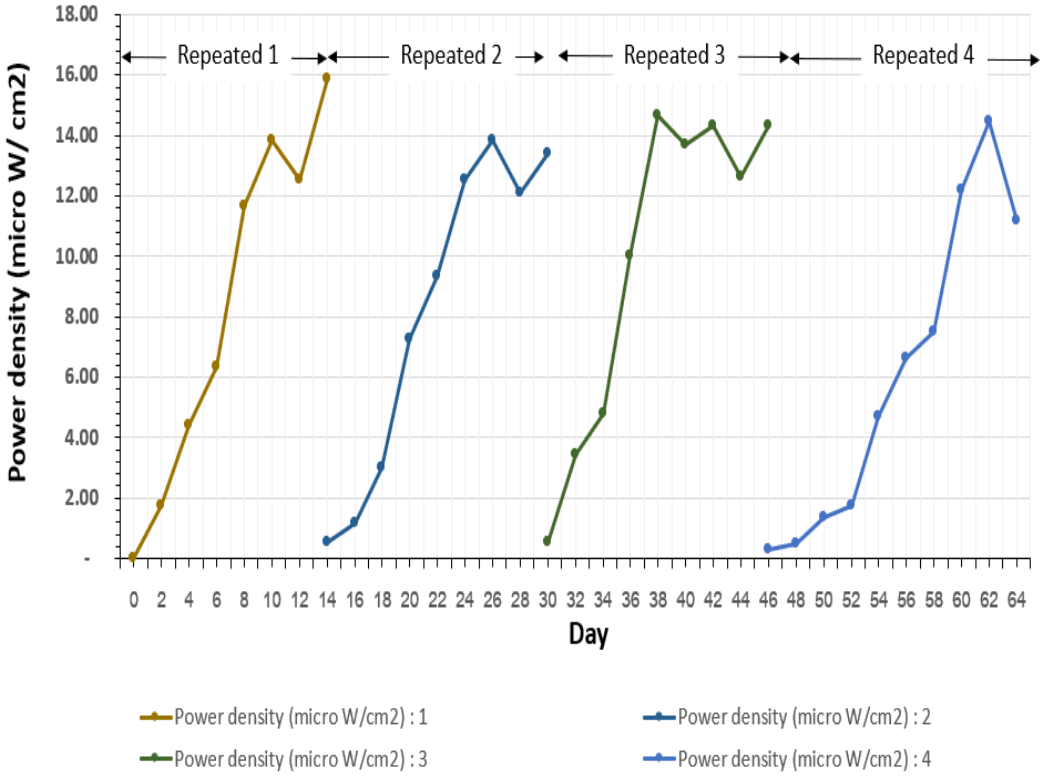
ในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์แบบกะในครั้งแรก (Repeated 1) การเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้นค่อนข้างรวดเร็ว ซึ่งเห็นได้จากการลดลงของความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด และค่า °Brix อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ ในวันที่ 14, 30 และ 46 ของการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นน้ำตาลสูงขึ้นหลังการเติมอาหารเหลวใหม่เข้าไปทดแทนอาหารเหลวเพาะเลี้ยงเก่า ซึ่งแสดงว่าจุลินทรีย์ที่หลงเหลือในระบบการเพาะเลี้ยงหลังจากการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่มีความแข็งแรงสมบูรณ์ดี และพร้อมเจริญเติบโตใหม่ได้ทันทีหลังการเติมอาหารเหลวใหม่ ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้ให้เห็นการเจริญของจุลินทรีย์ในช่วงระยะ Lag phase นั้นหายไป คงเหลือไว้ในช่วง exponential phase และ stationary phase ในระยะสั้นๆ เท่านั้น ซึ่งแสดงว่าจุลินทรีย์ยังคงอยู่ในช่วงของเซลล์ที่มีความแข็งแรงและยังไม่เข้าสู่ระยะ dead phase ซึ่งไม่พบในการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำในครั้งที่ 1 ถึง 3 และพบการเจริญลดลงเล็กน้อย ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงการเข้าสู่ระยะ dead phase เล็กนั้น ในกะซ้ำครั้งที่ 4



รูปที่ 12 ค่าการเปลี่ยนแปลง Voltage density และ Current density ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

อย่างไรก็ตาม รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของค่า Current density, voltage density และ power density มีความสอดคล้องสัมพันธ์ต่อรูปแบบการเจริญ (Growth curve) ของจุลินทรีย์ ซึ่งพบว่า เมื่อจุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง exponential phase ซึ่งเป็นช่วงที่กระบวนการเมตาบอลึซึมของเซลจุลินทรีย์เกิดขึ้นอย่างเต็มที่เพื่อมีการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสที่เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับใช้ในการเจริญและเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ ซึ่งในช่วงนี้เอง ที่มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนจากกระบวนการเมตาบอลึซึมจากภายในเซลล์จุลินทรีย์สู่ภายนอกไปยังอาหารเหลวเพาะเลี้ยง อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ จะถูกพาไปยังขั้วแอโนดโดยสารเมทิลลีนบลูที่เติมเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยง พร้อมการเกิดการเคลื่อนที่ของสารที่ให้ประจุบวก หรือ สารโปรตอนผ่านไปยังถังแคโทดทางเมมเบรนเลือกผ่าน Nefion ซึ่งการเกิดกระแสไฟฟ้าขึ้นในระบบเซลล์เพลิงจุลชีพนี้ ยืนยันให้เห็นถึงความสามารถในการนำจุลินทรีย์พด 2 มาใช้เป็นแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนในถังแอโนดได้ แต่อย่างไรก็ตาม ค่า Current density, voltage density และ power density นี้ มีค่าในระดับค่อนข้างต่ำมาก หากเปรียบเทียบกับการผลิตกระแสไฟฟาด้วยเซลล์เชื้อเพลิงทางเคมี ดังนั้น การพัฒนาระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ ควรมุ่งเน้นวัสดุที่นำมาใช้เป็นขั้วอิเล็คโทรด หรือขั้วคาโทด ซึ่งต้องมีความไวต่อ

การนำไฟฟ้าสูง สามารถรับอิเล็กตรอนและนำพาอิเล็กตรอนได้อย่างมีแม้ว่าจะมีความเข้มข้นอิเล็กตรอนต่ำก็ตาม และที่สำคัญที่สุด คือ วัสดุที่นำมาทำขั้วไฟฟ้านั้น ไม่ควรมีความเป็นพิษกับเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อส่งเสริมให้การเจริญของจุลินทรีย์เป็นไปอย่างปกติ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพการผลิตกระแสไฟฟ้าสูงสุดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพได้เป็นอย่างดี

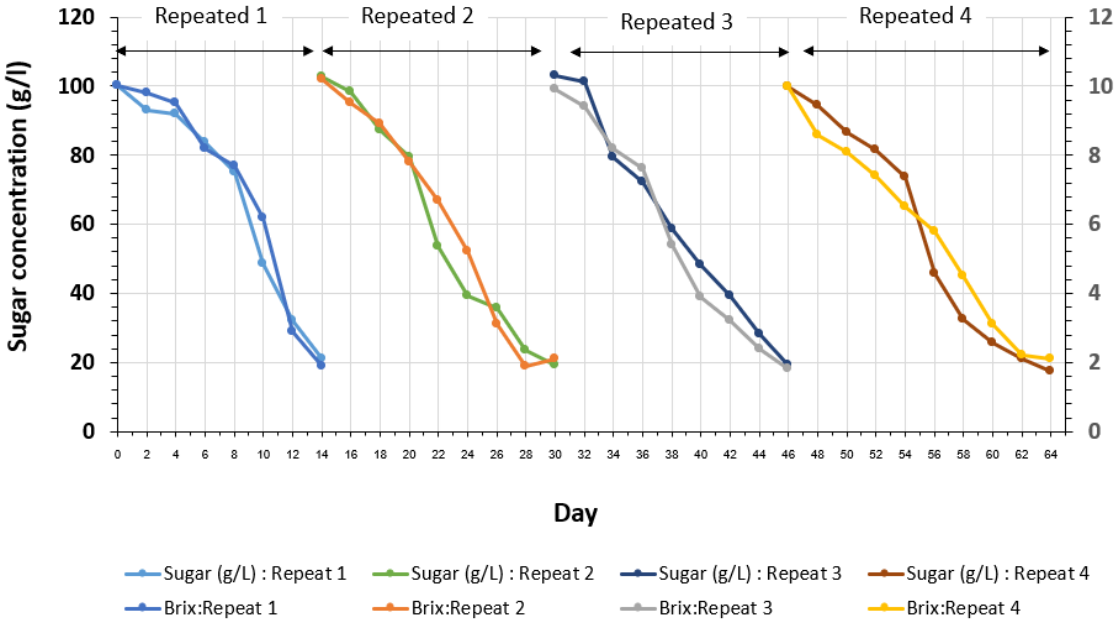


รูปที่ 13 ค่าการเปลี่ยนแปลง Power Density ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ

5.2.2 การผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยจุลินทรีย์พด ร่วมระหว่างการเจริญของราขาว

การทดลองในขั้นนี้ เนื่องจากไม่สามารถทำการเก็บตัวอย่างก้อนอาหารตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงราขาวได้เช่นในการทดลองขั้นต้นเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ ดังนั้น หากราขาวไม่สามารถเจริญได้ดีตามปกติ จะไม่สามารถตรวจพบการเกิดขึ้นหรือการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าได้ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพได้ เนื่องจาก ระหว่างการเจริญของราขาว จะมีการปลดปล่อยสารที่มีประจุบวกจำนวนมาก และความแรงของสารประจุบวกที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเจริญของราขาว มีค่าความแรงของประจุบวกสูงกว่าน้ำมาก ซึ่งจะทำให้เกิดการเคลื่อนไหล

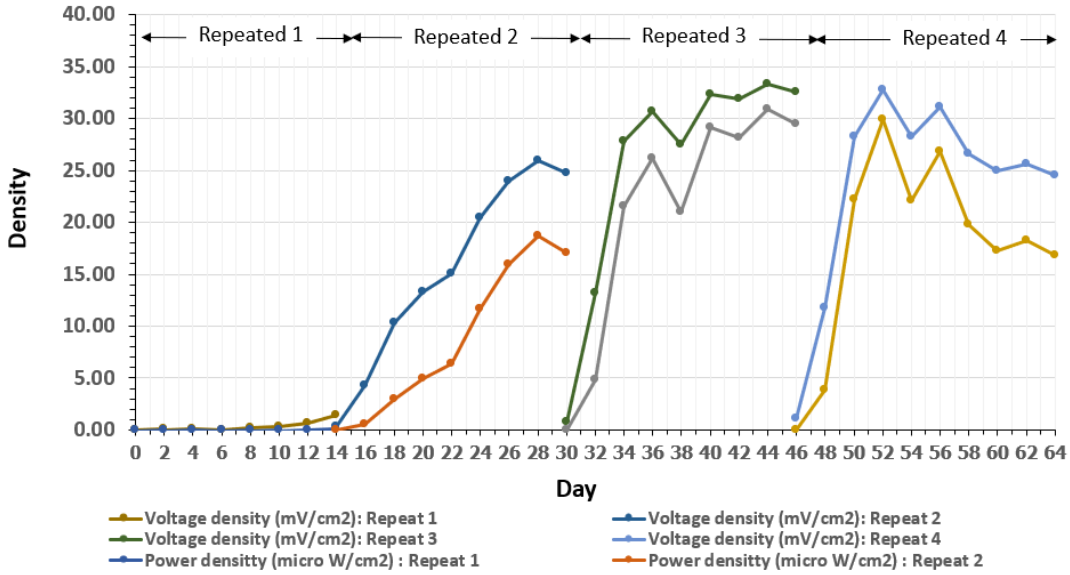
ของอิเล็กตรอนและโปรตอนได้อย่างครบวงจรและเกิดกระแสไฟฟ้าในระบบในที่สุด ดังนั้น หากการเจริญของราขาวลดลงหรือยุติลง สารประจุบวกหรือโปรตรอนเหล่านี้ จะไม่ถูกผลิตขึ้น ซึ่งทำให้การเคลื่อนไหลของอิเล็กตรอนและโปรตอนเกิดขึ้นในรูปแบบไม่ครบวงจรไฟฟ้า ดังนั้น จึงส่งให้ระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพนี้ ไม่สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้ในที่สุด



รูปที่ 14 การเจริญของจุลินทรีย์ในถังแอโนดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพในระบบ Biocathode

ทั้งนี้ หากพิจารณาในการเพาะเลี้ยงระยะกะช้ำครั้งที่ 1 (ระยะเวลาประมาณ 14 วันแรกของการดำเนินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ) ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์ในถังแอโนดจะเจริญได้อย่างเต็มที่ แต่การเจริญของรายังเกิดขึ้นไม่มากนัก เป็นเหตุให้สารเมตาบอไลท์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมหลักของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดยังไม่มากนัก เนื่องจากราที่อยู่ด้านบนของก้อนอาหารยังไม่เจริญลงมาสู่ด้านล้างและสัมผัสกับแผ่นสแตนเลสซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้วแคโทด ทำให้การเคลื่อนผ่านของสารที่ให้ประจุบวกหรือโปรตอนจากถังแอโนดมายังถังแคโทดไม่ได้สัมผัสและรวมตัวกับสารเมตาบอไลท์ที่ได้จากการเจริญของรามากนัก อย่างไรก็ตาม การเกิดกระแสไฟฟ้านี้ความชื้นภายในก้อนเชื้ออาหารรามีความสำคัญอย่างมาก ที่จะทำให้การเข้าจับของโปรตอนกับสารรับโปรตอนเกิดประสิทธิภาพ ทั้งนี้ เนื่องจากในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพด้วยระบบทางชีววิทยาในถังแคโทด ซึ่งเรียกว่า

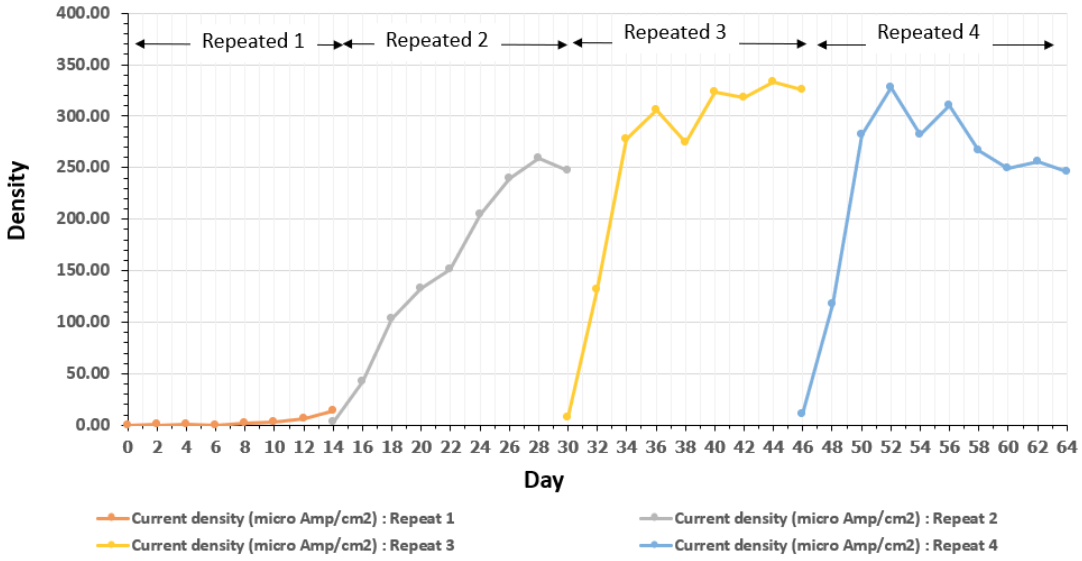
biocathode ซึ่งในสภาวะนี้ จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตที่ทำการเพาะเลี้ยงในถังแคโทดจะถูกเลี้ยงไว้ในสภาวะอาหารเหลว ซึ่งมีการกวนเล็กน้อย ส่งผลให้เกิดการกระจายตัวของสารเมตาบอไลซ์ที่เกิดจากการเจริญในถังแคโทดอย่างสม่ำเสมอ ไม่มีการขัดขวางการเคลื่อนที่และการเข้าจับกันของสารประจุบวก ประจุลบ อิเล็กตรอน และโปรตอน ส่งผลให้ประสิทธิภาพการของระบบเซลล์เชื้อเพลิงมีความเสถียรสูง และเสถียรกว่า Biocathode ที่เป็นระบบ solid state เช่นการเจริญของราขาวในการทดลองนี้เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ การเจริญของราขาวในการทดลองนี้ ไม่สมบูรณ์เพียงพอที่จะให้เกิดการออกดอกเห็ด โดยการเจริญยังคงอยู่ในรูปของเส้นใยเป็นหลัก



รูปที่ 15 ค่าการเปลี่ยนแปลง Voltage และ Power Density ในเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด, ค่า °Brix, ค่า Power density, Current density, และ Voltage density ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของราขาวในถังแคโทดในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ และการเจริญของจุลินทรีย์ในถังแอโนด ทั้งนี้ การเจริญของราขาวใช้ระยะเวลาโดยเฉลี่ยนประมาณ 45 วัน จนกระทั่งการเจริญของเส้นใยราสมบูรณ์ และการเจริญจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น จะกระทั่งในช่วงระยะเวลาการเจริญเกือบ 60 วัน การเจริญของราจะช้าลง เนื่องจากสารอาหารในก้อนเพาะเลี้ยงหมด และ

ค่อยๆ ตายไปทีละส่วน อย่างไรก็ตาม ขณะที่การเจริญของจุลินทรีย์เป็นการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำ ซึ่งจะต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารเหลวเก่าออกแล้วทดแทนด้วยอาหารเพาะเลี้ยงใหม่โดยเฉลี่ยทุก 14 วัน ซึ่งหลังจากการเปลี่ยนถ่ายสารอาหารนี้ ส่งให้ความสมดุลของการเคลื่อนไหลของอิเล็กตรอนและโปรตอนในระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพเปลี่ยนแปลงอย่างกระทันหัน ซึ่งเป็นผลจากการลดลงของจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ การลดลงของสารอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอไลท์ของจุลินทรีย์ ถึงแม้ว่าการเจริญของราขาวยังคงเกิดขึ้นอย่างปกติก็ตาม ปรากฏการณ์นี้ มีผลทำให้แรงดันไฟฟ้าของระบบลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ค่า Current density, Voltage density และ Power density ลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม หลังการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่เป็นระยะเวลา 2 วัน ระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพเริ่มเข้าสู่ระยะสมดุลอีกครั้ง ซึ่งปรากฏให้เห็นได้ค่อนข้างชัดเจนในการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำในครั้งที่ 2 ถึง 4



รูปที่ 16 ค่าการเปลี่ยนแปลง Current Density ในเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode

6. สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองทั้งหมด ยืนยันความเป็นไปได้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพชนิด Biocathode โดยการเจริญของราขาวในสภาวะ Solid state ได้ แต่ระบบยังคงให้ประสิทธิภาพของการผลิตกระแสไฟฟ้าด้วยระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพยังคงต่ำมาก และมีข้อจำกัดสูง โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงราขาวในถังแคโทด ซึ่งยังไม่สมบูรณ์เพียงพอที่จะชักนำให้เกิดการเกิดดอกของเส้นใยรา และที่สำคัญที่สุด คือ การเกิดการปนเปื้อนของราดำ หรือราเขียวระหว่างการเลี้ยงราขาวสูงมาก เป็นเหตุให้การเจริญของราขาวถูกยับยั้งหรือยุติหลายครั้งมาก ดังนั้นหากพิจารณาในการนำไปใช้ประโยชน์จริงต้องพัฒนาระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพให้มีขนาดของถัง biocathode ใหญ่เพียงพอที่จะบรรจุสารอาหารสำหรับการเจริญจนกระทั่งเข้าสู่ระยะการเกิดดอกของราขาว นอกจากนี้ ต้องพัฒนาหรือสรรหานวตกรรมที่สูงขึ้นเพื่อส่งเสริมให้การเคลื่อนไหลของอิเล็กตรอนและโปรตอนระบบให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Bruce E. Logan. (2009). Exoelectrogenic Bacteria That Power Microbial Fuel Cells. *Nature review/Microbiology*. 7: 375-381.

Brucee Logan; และคนอื่น ๆ. (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environmental Science & Technology*. 40(17): 5181-5192.

Cao Xiaoxin; และคนอื่น ๆ. (2008). Electricity Generation by an Enriched Phototrophic Consortium in a Microbial Fuel Cell. *Electrochemistry Communications*. 10(9): 1392-1395.

Catal T.; และคนอื่น ๆ. (2008b). Electricity Production from Polyalcohols in Single-Chamber Microbial Fuel Cells. *Biosens. Bioelectron.* 24: 855-860.

Davila D.; และคนอื่น ๆ. (2008). Development and Optimization of Microbial Fuel Cells. *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*. 11(2): 99-103.

Diver S. . (2001). *Nature Farming and Effective Microorganisms, Rhizosphere Ii.* Publications, Resource Lists and Web Links from Steve Diver.

Goldemberg J. . (2007). Ethanol for a Sustainable Energy Future. *Science*. 315: 808-810.

Greenman J.; และคนอื่น ๆ. (2009). Electricity from Landfill Leachate Using Microbial Fuel Cells: Comparison with a Biological Aerated Filter. *Enzyme Microb. Technol.* 44: 112-119.

He Z. L.; และคนอื่น ๆ. (2008). Development and Application of Functional Gene Arrays for Microbial Community Analysis. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 18(6): 1319-1327.

Higa T (1996). Effective Microorganism Microorganisms -Their Role in Kyusei Nature Farming and Sustainable Agriculture. *In Proceedings of the Third International Conference on Kyusei Nature Farming. Ed. Parr JF, Hornick SB, Simpson ME, USDA, Washington, USA*. 20-24.

Higa Teruo; และ Parr F. James. (1994). *Beneficial and Effective Microorganisms for a Sustainable Agriculture and Environment* International Nature Farming Research Center, Atami, Japan.

Hosseini Mir Ghasem; และ Ahadzadeh Iraj. (2013). Electrochemical Impedance Study on Methyl Orange and Methyl Red as Power Enhancing Electron Mediators in

Glucose Fed Microbial Fuel Cell. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 44(4): 617-621.

Katuri Krishna P.; และคนอื่น ๆ. (2011). Microbial Fuel Cells Meet with External Resistance. *Bioresource Technology*. 102(3): 2758-2766.

Lee Dae-Young; และคนอื่น ๆ. (2008). Development and Application of an Oligonucleotide Microarray and Real-Time Quantitative Pcr for Detection of Wastewater Bacterial Pathogens. *Science of The Total Environment*. 398(13): 203-211.

Levin DB.; และคนอื่น ๆ. (2006). Hydrogen Production by *Clostridium Thermocellum* 27405 from Cellulosic Biomass Substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*. 31: 1496-1503.

Liu Hong; Ramnarayanan Ramanathan; และ Logan Bruce E. (2004). Production of Electricity During Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell. *Environmental Science & Technology*. 38(7): 2281-2285.

Logan B.E.; และคนอื่น ๆ. (2007). Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air-Cathode Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* . 41: 3341-3346.

Luo Y.; และคนอื่น ๆ. (2010). Power Generation from Furfural Using the Microbial Fuel Cell. *J. Power Sources*. 195: 190-194.

Manohar A.K.; และ Mansfeld F. (2009). The Internal Resistance of a Microbial Fuel Cell and Its Dependence on Cell Design and Operating Conditions. *Electrochem. Acta*. 54: 1664-1670.

Min Booki; และ Logan Bruce E. (2004). Continuous Electricity Generation from Domestic Wastewater and Organic Substrates in a Flat Plate Microbial Fuel Cell. *Environmental Science & Technology*. 38(21): 5809-5814.

Mohan Y.; Kumar S. M. M.; และ Das D. . (2008). Electricity Generation Using Microbial Fuel Cells. *Int. J. Hydrogen Energ.* 33: 423-426.

Mohd Mustafa Al Bakri Abdullah; และคนอื่น ๆ. (2011). Production of Effective Microorganism Using *Halal*based Sources: A Review. *African Journal of Biotechnology*. 10(81): 18649-18652.

Office of Learning Development and Academic Services Valaya Alongkorn Rajabhat University Under The Royal Patronage. (2010). *Manual of Community Product for Sufficiency Economy.* Phra Nakhon Sri Ayutthaya Tienwattanaprinting co.,ltd.

Oh SangEun; Min Booki; และ Logan Bruce E. (2004). Cathode Performance as a Factor in Electricity Generation in Microbial Fuel Cells. *Environmental Science & Technology*. 38(18): 4900-4904.

Pant Deepak; และคนอื่น ๆ. (2010). A Review of the Substrates Used in Microbial Fuel Cells (Mfcs) for Sustainable Energy Production. *Bioresource Technology*. 101(6): 1533-1543.

Pham; และคนอื่น ๆ. (2004). Improvement of Cathode Reaction of a Mediatorless Microbial Fuel Cell. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14(2): 324-329.

Rabaey Korneel; และ Verstraete Willy. (2005). Microbial Fuel Cells: Novel Biotechnology for Energy Generation. *Trends in Biotechnology*. 23(6): 291-298.

Rahimnejad M.; และคนอื่น ๆ. (2011). Methylene Blue as Electron Promoters in Microbial Fuel Cell. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36(20): 13335-13341.

Rezaei F.; และคนอื่น ๆ. (2009b). Simultaneous Cellulose Degradation and Electricity Production by *Enterobacter Cloacae* in a Microbial Fuel Cell. *Appl. Environ. Microbiol*. 75 (11): 3673-3678.

Sang-Eun Oh; และ Logan Bruce E. (2006). Proton Exchange Membrane and Electrode Surface Areas as Factors That Affect Power Generation in Microbial Fuel Cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 70: 162-169.

Saratale G.; และ Oh S. . (2011). Production of Thermotolerant and Alkalotolerant Cellulolytic Enzymes by Isolated *Nocardiopsis* Sp. Knu. *Biodegradation* 22: 905-919.

Scott K.; และคนอื่น ๆ. (2007). Application of Modified Carbon Anodes in Microbial Fuel Cells. *Process Safety and Environmental Protection*. 85(5): 481-488.

Sharma Suresh K; และ Bulchandani B. D. (2012). Comparative Study of Various Substrates and Microorganisms in a Laboratory Designed Microbial Fuel Cell. *International Journal of Research in Chemistry and Environment* 2(3): 168-174.

Somogyi A.M. (1952). Note on Sugar Determinations. *Journal of Biological Chemistry*. 195: 19-23.

Sukkasem Chontisa; และคนอื่น ๆ. (2011). Upflow Bio-Filter Circuit (Ubfc): Biocatalyst Microbial Fuel Cell (Mfc) Configuration and Application to Biodesel Wastewater ATreatment *Bioresource Technology*. 102: 10363-10370.

Veeranjaneya Reddy L. ; Pradeep Kumar S. ; และ Wee Young-Jung. (2010). Microbial Fuel Cells (Mfcs) - a Novel Source of Energy for New Millennium. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*.

Von Canstein H.; และคนอื่น ๆ. (2008). Secretion of Flavins by *Shewanella* Species and Their Role in Extracellular Electron Transfer. *Applied and Environmental Microbiology*. 615-623.

Wang Chin-Tsan; Chen Wei-Jung; และ Huang Ruei-Yao. (2010). Influence of Growth Curve Phase on Electricity Performance of Microbial Fuel Cell by *Escherichia Coli. International Journal of Hydrogen Energy*. 35(13): 7217-7223.