บทที่ 4

วิจารณ์ผล และ บทสรุป

ผลการเลือกสภาวะการตรึง GOx บนผ้าไนลอนได้ผลเทียบกับวิธีของ Mascini(14) ดังนี้

1. กระตุ้นด้วยไดเมทิล ซัลเฟต 5 นาที เท่ากัน

2. ใช้เฮกซาเมทิลินไดอามีนเข้มข้นเพียง 1% พีเอช9 ติดด้วยเวลา 45 นาที ขณะที่ Mascini ใช้ไลซีนเข้มข้นถึง 7.3% พีเอช9 ติดด้วยเวลา 2 ชั่วโมง

3. ใช้กลูตารัลดีไฮด์เข้มข้น 1% พีเอช9 ติดเป็นเวลา 45 นาที ขณะที่ Mascini ใช้เข้มข้นถึง 12.5% พีเอช8.5 เป็นเวลา 45 นาที

4. ตรึงด้วย GOx เข้มข้น 0.3% พีเอช7 เวลา 2 ชั่วโมงเท่ากัน

5. ได้ GOx ตรึงบนผ้าไนลอนมี V_{max} ประมาณ 200 นาโนโมล/นาที ซม^2 ของ Mascini มี specific immobilized enzyme activity 100-150 นาโนโมล/นาที ซม^2

GOx เมื่อถูกตรึงบนผ้าไนลอน มีคุณสมบัติต่างออกไปจาก GOx อิสระคือสามารถใช้งานได้ดีในช่วงพีเอช 5 ถึง 8 (GOx อิสระมีพีเอช 2 ถึง 8) และมีพีเอชที่เหมาะสมคือ 6.5 ถึง 7 (GOx อิสระมีพีเอช 5.6) มีเสถียรภาพที่พีเอช8 และ 9 พอๆกัน ขณะที่ GOx อิสระจะเหลือแอคติวิตี 10% ที่พีเอช 8.1 ไนลอนเป็นตัวกลางที่มีประจุลบ ตัวกลางที่ใช้ตรึงเอนไซม์ซึ่งมีประจุลบจะดึงดูดไฮโดรเจนไอออน ทำให้สภาพแวดล้อมของเอนไซม์มีพีเอชเป็นกรดมากกว่าพีเอชในเนื้อสารละลาย ดังนั้นเอนไซม์จะทำงานได้ดี เมื่อพีเอชในเนื้อสารละลายสูงขึ้น

GOx ตรึงบนผ้าไนลอนสามารถใช้งานได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °ซ ถึง 45 °ซ แต่ที่อุณหภูมิ 40 °ซขึ้นไปเอนไซม์จะถูกทำลายเร็ว ดูได้จากการหาพลังงานกระตุ้นในการวัดกลูโคสด้วย GOx ตรึงบนผ้าไนลอน พบว่าที่อุณหภูมิ 41 และ 45 °ซ จะให้ค่าพลังงานกระตุ้นเบี่ยงเบนลดลงไปจากที่ควรจะเป็น เนราะเอนไซม์ถูกทำลายไปมาก ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 40 °ซ เอนไซม์มีเสถียรภาพดี มีเวลาครึ่งอายุประมาณ 11 ถึง 6 วัน ดังนั้นในการใช้งานควรใช้ที่อุณหภูมิช่วง 30-40 °ซ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 °ซ GOx ตรึงบนผ้าไนลอนจะถูกทำลายอย่างรวดเร็วภายใน 2-3 นาที เหมือน GOx อิสระ

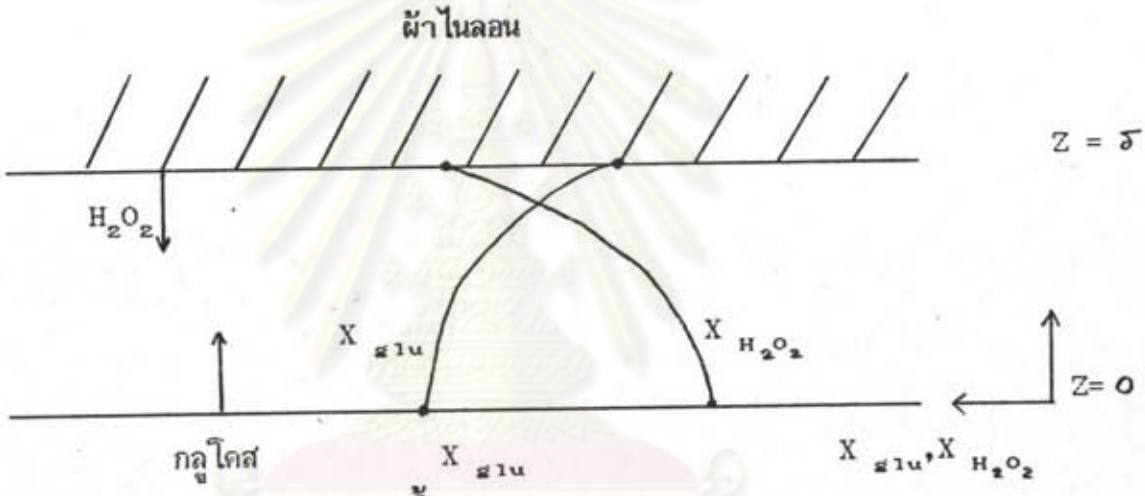
รูปแบบการถ่ายเทมวลที่บริเวณรอยต่อระหว่างผิวของเนื้อสารละลายกับผ้าไนลอน ดังรูปที่4.1 เสมือนเกิดฟิล์มของเหลวบาง ๆ ซึ่งกลูโคสจะต้อง diffuse ผ่าน ฟิล์มบางนี้เมื่อเปลี่ยนรอบของการกวนที่ใช้ ไม่ค่อยมีผลทำให้ flux ของกลูโคสเปลี่ยนแปลงไป แต่ถ้าเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือความเข้มข้นจะมีผลต่อ flux การถ่ายเทมวลที่ฟิล์มของเหลวจะเป็นไปตามสมการ ดังนี้ (21)

$$N_{glu_z} = - c D \frac{\partial X}{\partial Z}_{glu} + X_{glu} (N_{glu_z} + N_{H_2O_2})$$

flux ของกลูโคส ตามแนวแกน Z

flux ของกลูโคส เนื่องจาก diffusion

flux ของกลูโคส เนื่องจาก bulk flow



รูปที่ 4.1 รูปแบบและปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นที่ฟิล์มของเหลวบางระหว่างผ้าไนลอนกับเนื้อสารละลาย

จากผลการทดลอง $N_{H_2O_2} = - 0.99 N_{glu}$

จะได้ $N_{glu} = - c D \frac{\partial X}{\partial Z}_{glu} = - D \frac{\partial C}{\partial Z}_{glu}$

เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงไป จะมีผลต่อค่าdiffusivityของกลูโคส ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่า D (diffusivity) ของกลูโคส ที่อุณหภูมิต่างๆ (20)

อุณหภูมิ (°ซ)	26	29	32	35	38	41	45
D x10^{-5} (ซม.^{2}/วินาที)	0.708	0.764	0.822	0.883	0.9452	1.01	1.1

เมื่อเขียนกราฟระหว่างค่า ln D กับ 1/T ได้ความชันใกล้เคียงกับการหาค่าพลังงานกระตุ้นในการวัดกลูโคส (ดูภาคผนวก จ) อาจกล่าวได้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิไม่ได้มีผลโดย

ตรงต่ออัตราการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ แต่เป็นการเพิ่มค่า D ของกลูโคสในฟิล์มบาง ๆ diffusion ในฟิล์มบางจึงเป็นปัจจัยจำกัดในการกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา

ชั้นของผ้าไนลอนและแผ่น CA เป็นตัวกำหนดเวลาแสดงสัญญาณผ้าไนลอนมีความหนา 100 ไมโครเมตร แผ่น CA หนาประมาณ 20 ถึง 45 ไมโครเมตร H_2O_2 ที่เกิดขึ้นที่ชั้นผ้าด้านหน้าต้อง diffuse ผ่านเนื้อผ้าและแผ่น CA เข้ามาทำปฏิกิริยาที่อิเล็กโทรด ในขณะล้างมีเวลาล้าง เข้าสู่ศูนย์บ้าง ๆ กับตอนเริ่มวัดเข้าสู่ steady state ต้องให้ H_2O_2 ที่ค้างอยู่ diffuse ออกจากผ้าไนลอนและแผ่น CA

การวัดกลูโคสด้วย GOx ตรึงบนผ้าไนลอนโดยใช้ H_2O_2 อิเล็กโทรด ได้ค่าความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกลูโคสกับกระแสไฟฟ้าเป็นเส้นตรง เพราะว่าปริมาณกลูโคสที่ใช้วัด คือ 0 ถึง 150 ppm น้อยกว่า ค่า K_m คือ 1330 ppm ถ้าใช้กลูโคสเข้มข้นมากกว่า 200 ppm พื้นที่ผิวของอิเล็กโทรดจะจำกัด ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาของ H_2O_2 ที่อิเล็กโทรดเป็นตัวกำหนดการวัดที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสดังกล่าวไม่ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาของกลูโคสถูกจำกัดด้วยปริมาณออกซิเจน พบว่าปริมาณออกซิเจนลดลงน้อยมาก ระดับความเข้มข้นของกลูโคสที่ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาถูกจำกัดด้วยปริมาณกลูโคส คือ กลูโคสเข้มข้นตั้งแต่ 1500 ppm ขึ้นไปเมื่อวัดด้วยออกซิเจนอิเล็กโทรด และที่ความเข้มข้นนี้ปริมาณออกซิเจนยังไม่ถูกจำกัด คือ ยังมีออกซิเจนที่ละลายเหลืออยู่ แต่อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะถูกจำกัดด้วยอัตราเร็วที่เร่งด้วยเอนไซม์ตามสมการ Michaelis

จากผลการทดลองที่ได้ สรุปว่า

4.1 เลือกสภาวะในการตรึง GOx บนผ้าไนลอน ดังนี้

4.1.1 กระตุ้นด้วยไดเมทิล ซัลเฟต 5 นาที ในอ่างน้ำเดือด

4.1.2 ติดด้วยเฮกซาเมทิลีนไดอามีนเข้มข้น 1% พีเอช 9 เวลา 45 นาที

4.1.3 ติดด้วยกลูตารัลดีไฮด์เข้มข้น 1% พีเอช 9 เวลา 45 นาที

4.1.4 ตรึงด้วย GOx เข้มข้น 0.3% พีเอช 7 เวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งค้างคืนที่ 4 °ซ

4.2 สภาวะต่าง ๆ ในการวัดปริมาณกลูโคสด้วย GOx ตรึงบนผ้าไนลอน

4.1.1 สามารถใช้งานได้ดีในช่วงพีเอช 5 ถึง 8 พีเอชที่เหมาะสม คือ พีเอช 6.5 ถึง 7

4.2.2 สามารถใช้งานได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 ถึง 45 °ซ มีพลังงานกระตุ้นในการวัดกลูโคสคือ 5.7 กิโลคาลอรี/โมล เมื่อใช้อุณหภูมิสูงกว่านั้น เช่น ตั้งแต่ 50 °ซ ขึ้นไป เอนไซม์จะถูกทำลายเร็วมากภายในเวลา 2-3 นาที มีพลังงานกระตุ้นในการทำลายเอนไซม์คือ 26.4 กิโลคาลอรี/โมล

4.2.3 ช่วงพีเอช 6 ถึง 7 GOx จะมีเสถียรภาพต่อพีเอชดีที่สุด

4.2.4 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ GOx จะมีเสถียรภาพต่อการใช้งานดีกว่าที่อุณหภูมิ 35 และ 40 °ซ และมีเวลาครึ่งอายุประมาณ 11 7 และ 6 วัน ตามลำดับ

4.2.5 GOx มีค่าคงที่ Michaelis ปรากฏ (K_m app) คือ 7.4 มิลลิโมลาร์ และอัตราเร็วสูงสุดปรากฏ (V_{max} app) คือ 1 ไมโครโมล/นาที

4.2.6 แผ่น CA ช่วยป้องกันสารรบกวนได้ดี เช่น วัดกลูโคสเมื่อมีกรดแอสคอบิกที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับกลูโคสอยู่ด้วย จะให้ค่าผิดพลาดไป 3 เปอร์เซนต์

4.2.7 ผลของการกวนที่ความเร็วรอบต่างกันมาก ให้ผลการวัดต่างกันประมาณ 6-10 % ในการใช้งานควรใช้ความเร็วรอบเท่ากันตลอด

4.2.8 การวัดปริมาณกลูโคสให้ความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้าที่วัดได้กับปริมาณกลูโคสเป็นเส้นตรงดี เหมาะจะใช้ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 150 ppm ทุกครั้งที่ใช้งานเครื่องใหม่ต้องทำกราฟมาตรฐานใหม่เสมอ เมื่อวัดตัวอย่าง 15 ครั้งมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 1.7 % มีเวลาแสดงสัญญาณประมาณ 1 ถึง 2 นาที

4.2.9 เมื่อวัด H_2O_2 ผ้าไนลอนจะช่วยให้ลักษณะสัญญาณสั่นน้อยลง แต่เวลาแสดงสัญญาณเพิ่มขึ้นจากครึ่งนาทีเป็น 1 นาที และ sensitivity ลดลง 20 เท่า

4.2.10 เมื่อใช้วัดกลูโคส ปริมาณออกซิเจนที่ละลายลดลงเพียง 0.36 % H_2O_2 ที่เกิดขึ้น 99 % จะละลายออกมาสู่เนื้อสารละลาย อีก 1 % เข้าทำปฏิกิริยาที่ขั้วอิเล็กโทรด

4.2.11 เมื่อวัดด้วยออกซิเจนอิเล็กโทรด สามารถใช้วัดกลูโคสได้ในช่วงความเข้มข้นประมาณ 0 ถึง 1500 ppm แต่มี sensitivity ไม่ดี ไม่เหมาะกับการใช้วัดปริมาณกลูโคสน้อย ๆ

4.2.12 เมื่อวัดกลูโคสโดยใช้อุปกรณ์ควบคุมการผสม ให้ผลการวัดดีมาก ใช้วัดกลูโคสได้ในช่วงความเข้มข้นประมาณ 0 ถึง 220 ppm

4.2.13 เมื่อไม่ใช้งานควรเก็บผ้าไนลอนตริง GOx ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในสารละลายโซเดียมเบนโซเอท เข้มข้น 0.1% ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7