บทที่ 1

บทนำ

เอนไซม์อิเล็กโทรดเป็นการนำเทคนิคทางชีวเคมี และไฟฟ้าเคมีมาผสมผสานกันเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจ (1) เอนไซม์ติดอยู่บนปลายของอิเล็กโทรดทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมี และมีความจำเพาะเจาะจงสูงกับสับสเตรทจึงสามารถวิเคราะห์หาปริมาณสับสเตรทที่สนใจได้แม้จะมีปริมาณน้อยๆ และวิเคราะห์ได้รวดเร็ว เอนไซม์อิเล็กโทรดจึงมีประโยชน์มากในการวิเคราะห์หาปริมาณสารทางชีวเคมี อาหาร การแพทย์ สิ่งแวดล้อม และในทางเทคโนโลยีชีวภาพ

1. การตรึงเอนไซม์

เอนไซม์เป็นสารที่มีราคาแพงและเตรียมได้ยาก(1) การตรึงเอนไซม์จะทำให้สามารถใช้เอนไซม์ได้หลายครั้ง ช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย นอกจากนี้การตรึงเอนไซม์ยังอาจช่วยเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ เมื่อนำเอนไซม์มาตรึงรวมกันจะทำให้เกิดบริเวณเข้มข้นสูง (concentrate zone) ของเอนไซม์ การตรึงเอนไซม์แล้วติดบนอิเล็กโทรดจึงเป็นเทคนิคที่น่าพิจารณามาก เพราะจะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้มากในบริเวณเล็ก ๆ ใกล้ผิวอิเล็กโทรด สามารถวัดหาปริมาณสารที่มีน้อย ๆ ได้

การตรึงเอนไซม์มีหลายวิธี เช่น

1. การตรึงเป็นแคปซูลขนาดเล็ก เป็นการตรึงเอนไซม์ในลูกทรงกลมผนังบางแบบกึ่งซึมผ่านได้ (semipermeable membrane) ผนังบางนี้จะไม่ยอมให้เอนไซม์ที่ถูกกักไว้ภายในซึมผ่านออกมา แต่จะยอมให้สับสเตรทและผลิตภัณฑ์ซึมผ่านออกมาได้ การทำให้เกิดลูกทรงกลมจะทำลายเอนไซม์ไปบางส่วน เทคนิคนี้ยังไม่ค่อยนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์สำหรับทำเอนไซม์อิเล็กโทรด

2. การดูดซับบนพาหะเฉื่อย การดูดซับเอนไซม์บนพาหะเฉื่อยเกิดขึ้นเนื่องจากแรงดึงดูดได้หลายแบบ เช่น พันธะเชิงไอออน พันธะไฮโดรเจน แรงวันเดอร์วาล พาหะเฉื่อยที่ใช้อาจเป็นแก้ว ซิลิกาเจล อะลูมินา เรซินแลกเปลี่ยนประจุภาค (ion exchange resin) เบนโทไนต์ วิธีการนี้ดีตรงที่เกิดการตรึงง่าย ไม่ซับซ้อน และสภาวะในการตรึงไม่รุนแรง แต่แรงดึงดูดดังกล่าวไม่ใช่แรงที่เกิดอย่างถาวร จึงเป็นปัญหาอย่างมากสำหรับการตรึงวิธีนี้ เอนไซม์ที่ตรึงอยู่อาจหลุดได้ขึ้นอยู่กับพีเอช ตัวทำละลาย สับสเตรท และอุณหภูมิ

3. การเชื่อมโยงด้วยพันธะโคเวเลนต์เป็นอนุภาคขนาดใหญ่โดยใช้สารไบฟังชันแนล สารไบฟังชันแนลจะทำหน้าที่ตรึงเอนไซม์กับโปรตีนอื่นโดยเกิดพันธะเชื่อมระหว่างโมเลกุล ทำให้เกิดอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้น ตัวอย่างสารไบฟังชันแนล เช่น กลูตารัลดีไฮด์ บิสไดเอโซเบนซิดีน-2,2-ไดซัลโฟนิคแอซิด โทลูอีน-2-ไอโซไซยาเนต-4-ไอโซไทโอไซยาเนต วิธีการตรึงแบบนี้จะเกิดง่าย ไม่ค่อยซับซ้อน สามารถควบคุมคุณสมบัติทางกายภาพและขนาดของอนุภาคที่ตรึงได้ ข้อเสียของวิธีนี้ คือ เอนไซม์จะเสียแอคติวิตีไปในกระบวนการตรึงด้วยสารพวกนี้ วิธีนี้จึงมีข้อจำกัดในการนำไปใช้งาน แต่ก็มีสารไบฟังชันแนลตัวหนึ่งคือ กลูตารัลดีไฮด์ นิยมนำมาใช้ตรึงและให้ผลการตรึงดี

4. การกักขังแบบกายภาพภายในโพรงของเจล เกิดจากการทำปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชันในสารละลายที่มีเอนไซม์อยู่ด้วยแล้วเกิดเป็นโครงสร้างของเจลขึ้นมาครอบคลุมเอนไซม์ขังอยู่ตามโพรงในโครงสร้างของเจลเหล่านี้ โพลีเมอร์ที่นิยมใช้เตรียมจากปฏิกิริยาระหว่างอะครีลามีดโมโนเมอร์กับสารเชื่อมโยงเอ็น,เอ็น-เมทิลีนบิสอะครีลามีด รูปแบบของเจลที่เตรียมได้อาจเป็นฟิล์มบาง เป็นชั้น ๆ หรือเป็นก้อนขนาดต่าง ๆ ตามความต้องการในการใช้งาน เช่น บรรจุในคอลัมน์ นอกจากนี้ยังมีเจลชนิดอื่นอีก เช่น เจลของแป้ง วิธีการตรึงแบบนี้สภาวะการตรึงจะไม่รุนแรง ไม่ค่อยจะทำลายเอนไซม์ แต่มีข้อจำกัดว่า ขนาดของโพรงเหล่านี้จะกระจัดกระจายไม่แน่นอน บางทีมีโพรงใหญ่พอที่เอนไซม์อาจหลุดออกมาได้ การซึมผ่านของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ภายในเจลจะเกิดได้ดีเฉพาะสารที่เป็นโมเลกุลเล็ก

5. การเชื่อมติดกับตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำด้วยพันธะโคเวเลนต์ วิธีการเลือกตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำดูจากคุณสมบัติเฉพาะของมัน เช่น การละลายน้ำ กลุ่มฟังชันแนลที่มีอยู่ เสถียรภาพทางกล พื้นที่ผิว การบวมน้ำ ไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) หรือ ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) โดยทั่วไปจะแบ่งตัวกลางนี้ออกเป็น 3 พวกใหญ่ ๆ คือ สารอนินทรีย์ โพลีเมอร์ตามธรรมชาติ และโพลีเมอร์สังเคราะห์ ตัวอย่างของตัวกลางดังกล่าว เช่น พอรัส กลาส (porous glass) โพลีอะครีลามีด โพลีสไตรีน ไนลอน เซลลูโลส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส การตรึงวิธีนี้เกิดจากการเชื่อมระหว่างกลุ่มฟังชันแนลบนตัวกลางกับของเอนไซม์ เกิดปฏิกิริยาเชื่อมกันเป็นพันธะโคเวเลนต์ใหม่ บางครั้งจะนำตัวกลางมากระตุ้นโดยเปลี่ยนให้เป็น derivatives ต่าง ๆ การเชื่อมเอนไซม์ติดกับตัวกลางจะพยายามเชื่อมโดยใช้กลุ่มฟังชันแนลของเอนไซม์ที่ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาการเร่งด้วยเอนไซม์ แต่บางครั้งก็ควบคุมไม่ได้ เพราะเกิดการเชื่อมแบบสุ่ม ส่วนของกรดอะมิโนที่เหมาะกับการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ เช่น หมู่อะมิโนที่ตำแหน่ง α และ ε หมู่ฟีนอลของไทโรซีน หมู่คาร์บอกซิลที่ตำแหน่ง β และ γ หมู่ซัลไฮดริลของซิสติอีน หมู่ไฮดรอกซิลของเซรีน วิธีการตรึงแบบนี้เป็นที่นิยมมาก เพราะเอนไซม์จะยังอยู่ในสภาวะธรรมชาติของมันเป็นส่วนใหญ่ เอนไซม์มักจะมีประสิทธิภาพดี และมักจะมีอายุการใช้งานยาวนานกว่าวิธีการตรึงแบบอื่น ๆ

ลักษณะที่ต้องการของการตรึงเอนไซม์ ในการทำเอนไซม์อิเล็กโทรด คือ

1. การตรึงเอนไซม์ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่หายาก
2. มีแอคติวิตีสูง สามารถใช้วัดความเข้มข้นของสับสเตรทต่ำ ๆ ได้
3. ให้ผลที่ถูกต้องอย่างสม่ำเสมอ
4. มีอายุการใช้งานยาวนาน ใช้งานได้นานโดยมีการสูญเสียแอคติวิตีช้า ๆ
5. มีเวลาแสดงสัญญาณเร็ว
6. มีเสถียรภาพทางกลที่ดี ไม่ฉีกขาดง่าย ใช้งานได้สะดวก

2. <u>การวัดหาปริมาณของสับสเตรทด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรด</u>

ในการวัดหาปริมาณของสับสเตรทด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรดจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท มีกลไกของการเกิดปฏิกิริยาดังนี้(3) คือ

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P$$

เมื่อ k_{+1}, k_{-1}, k_{+2} คือ ค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยา

E คือ เอนไซม์

S คือ สับสเตรท

P คือ ผลิตภัณฑ์

อัตราเร็วของปฏิกิริยา (V) จะเป็นไปตามสมการของ Michaelis-Menten คือ

$$V = \frac{V_{max}\, s}{K_m + s}$$

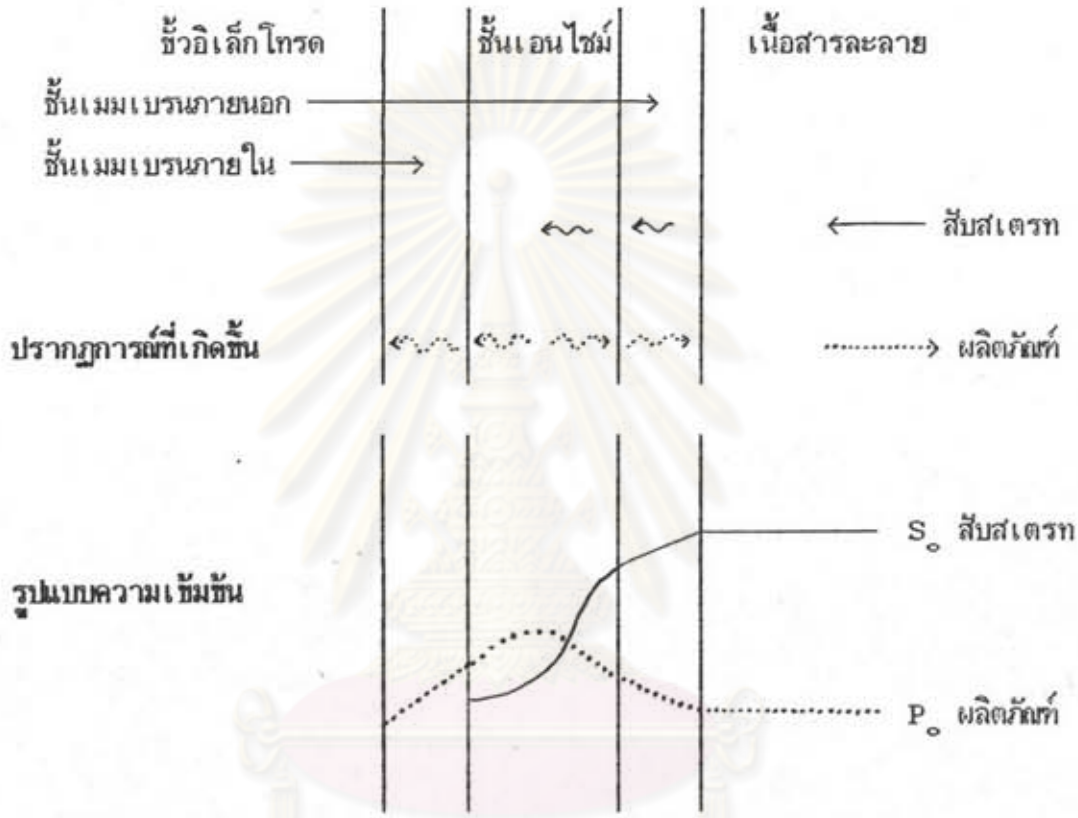
V_{max} คือ อัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด

s คือ ความเข้มข้นของสับสเตรท

K_m คือ ค่าคงที่ Michaelis

การวัดด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรดจะเป็นการวัดในแบบจลน์ศาสตร์(3)คือ ความเข้มข้นของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์จะเปลี่ยนแปลงไปกับเวลา ความเข้มข้นของสับสเตรทจะเป็นตัวจำกัดของอัตราเร็วปฏิกิริยา ในกรณีนี้ความเข้มข้นของสับสเตรทต้องมีค่าน้อยกว่า K_m ซึ่งเป็นขีดจำกัดการใช้งานที่ยังให้กราฟมาตรฐานระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของสับสเตรทเป็นเส้นตรง ที่ผิวอิเล็กโทรดจะมีเอนไซม์ถูกตรึงอยู่ ทำให้เกิดบริเวณเข้มข้นของเอนไซม์ไม่เกิดการจำกัดด้วยปริมาณของเอนไซม์เมื่อเทียบกับสับสเตรทในขนาดปริมาตรเดียวกัน อัตราการเกิดปฏิกิริยาจึงถูกจำกัดด้วยความเข้มข้นสับสเตรท ขณะเดียวกันสับสเตรทที่ความเข้มข้นคงที่ค่าหนึ่งจากในสารละลายมีปริมาตรมากพอที่จะป้อนให้สู่บริเวณเกิดปฏิกิริยา จึงเกิดปฏิกิริยาตามสมการ Michaelis-Menten ในแบบจลน์ศาสตร์ไปเรื่อย ๆ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่บริเวณปฏิกิริยาจะเคลื่อนที่เข้าสู่เนื้อสารละลายและขั้วอิเล็กโทรด จึงเสมือนว่าเกิดสมดุลระหว่างการเคลื่อนที่ของสับสเตรทเข้าทำปฏิกิริยาที่ผิวเอนไซม์อิเล็กโทรด กับการเคลื่อนที่ของผลิตภัณฑ์จากบริเวณเกิดปฏิกิริยาสู่สารละลายและขั้วอิเล็กโทรด

กำหนดให้รูปแบบการตรึงเอนไซม์ที่ผิวอิเล็กโทรดประกอบด้วย ขั้วอิเล็กโทรด เมมเบรนภายในป้องกันสารรบกวน เช่น แผ่นเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตต ชั้นของเอนไซม์ เมมเบรนภายนอกป้องกันเอนไซม์หลุดด้วยการกักขัง และเนื้อสารละลาย ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 รูปแบบเอนไซม์อิเล็กโทรดและปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นที่ผิวอิเล็กโทรด

ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นที่ผิวเอนไซม์อิเล็กโทรดมีขั้นตอนดังนี้

1. สับสเตรทเคลื่อนที่จากเนื้อสารละลายไปที่เมมเบรนภายนอก
2. สับสเตรทซึมผ่านเมมเบรนภายนอก
3. สับสเตรทเข้าทำปฏิกิริยากับชั้นเอนไซม์เกิดเป็นผลิตภัณฑ์
4. ผลิตภัณฑ์ซึมผ่านชั้นเอนไซม์
5. ผลิตภัณฑ์ซึมผ่านชั้นเมมเบรนภายใน
6. ผลิตภัณฑ์เข้าทำปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีที่ขั้วอิเล็กโทรด จะมีผลิตภัณฑ์บางส่วนซึมผ่านกลับออกมาสู่เนื้อสารละลาย

ถ้ากำหนดให้การกวนในเนื้อสารละลายดี อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะถูกจำกัดด้วยความเข้มข้นของสับสเตรท ซึ่งให้มีค่าน้อยกว่า K_m มาก อัตราการถ่ายเทมวลจากเนื้อสารละลายไปที่ชั้นเอนไซม์ คือ $N_s = k_s (S_o - S)$ จะเท่ากับ อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ชั้นเอนไซม์ คือ $V = V_{max} S / (K_m + S)$ เมื่อ $K_m >> S$ ได้ $V = V_{max} S / K_m$

จะได้ว่า $$k_s (S_o - S) = V_{max} S / K_m$$

จัดรูปสมการใหม่ได้ S เป็นฟังชัน S_o ดังนี้ $$S = \frac{K_m k_s}{V_{max} + K_m k_s} S_o$$

แทนค่า S จะได้ $$N_s = \frac{1}{1/k_s + K_m/V_{max}} S_o = K S_o$$

N_s คือ molar flux มีหน่วยเป็น โมลต่อเวลาต่อพื้นที่

k_s คือ สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลในเนื้อสารละลาย

K คือ ค่าคงที่

S_o และ S คือ ความเข้มของสับสเตรทในเนื้อสารละลายและที่ผิวเมมเบรนชั้นในตามลำดับ

ดังนั้นค่าที่วัดได้ด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรดจะเป็นฟังชันเส้นตรงกับสับสเตรท เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทน้อยกว่าค่า K_m มาก

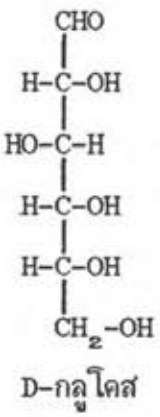
3. <u>กลูโคส</u>

กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) (2;4;5) เป็นน้ำตาลที่มีอยู่ในธรรมชาติมากที่สุด(4) อาจอยู่ในรูปน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอิสระ เช่น ในน้ำผึ้ง ผลไม้ ในสัตว์จะพบกลูโคสในเลือดปริมาณค่อนข้างคงที่ กลูโคสอาจเชื่อมด้วยพันธะเคมีกับตัวมันเองหรือน้ำตาลอื่น เช่น เป็นโพลีเมอร์ของแป้ง เซลลูโลส ไกลโคเจน น้ำตาลซูโครสก็เป็นน้ำตาลที่ประกอบด้วยกลูโคสและฟรักโทส

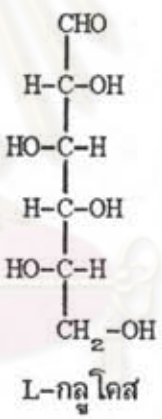
กลูโคสมีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวภาพมาก เพราะเป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจนของสิ่งมีชีวิต ถ้าขาดกลูโคสแล้วแทบจะกล่าวได้ว่าสิ่งมีชีวิต

ในโลกนี้ไม่อาจดำรงชีวิตอยู่ได้เลย ในกระบวนการผลิตต่างๆ เช่น การหมัก การย่อยแป้ง การผลิตสารให้ความหวาน ต้องมีการควบคุม ดูแล ติดตาม ศึกษาปริมาณกลูโคสที่เปลี่ยนแปลงไป บางครั้งกลูโคสอาจเป็นสารที่ต้องการกำจัดในไข่และไข่ขาวเพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาลเมื่อทำไข่แห้งหรือในการกำจัดของเสีย ในระบบต่างๆของสิ่งมีชีวิตต้องมีการควบคุมปริมาณกลูโคสให้คงที่ระดับหนึ่งเพื่อให้ดำรงชีพอยู่ได้อย่างปกติ กลูโคสใช้ร่วมกับเอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส และคะตาเลส สามารถใช้ควบคุมปริมาณออกซิเจนในอุตสาหกรรมด้านอาหารได้หลายแบบ เช่น เครื่องดื่มกระป๋อง เบียร์ ไวน์ มายองเนส สลัด กาแฟ นมผง อาหารแห้งต่าง ๆ ความสำคัญต่างๆของกลูโคสดังกล่าว จึงจำเป็นต้องมีเครื่องมือวัดกลูโคสที่มีประสิทธิภาพ

กลูโคสที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูป D ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ทางโครงสร้างเคมีแบบฟิชเชอร์โปรเจกชันของคาร์บอนตัวที่ 5 ในโมเลกุลว่ามีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ทางขวา

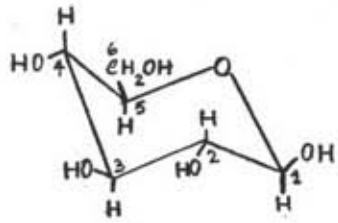


D-กลูโคส

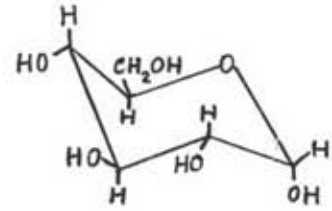


L-กลูโคส

สารละลายของกลูโคสจะหมุนระนาบของแสงโพลาไรซ์ได้ เพราะมีคาร์บอนอะตอมที่ไม่สมมาตร พบว่า D-กลูโคสจะหมุนระนาบไปทางขวาเป็น dextrorotatory ใช้สัญญลักษณ์ (d) หรือ (+) จึงเขียนเป็น D(+)-กลูโคส ในสภาพสารละลายกลูโคสส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของโครงสร้างเป็นวงแบบ pyranose ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของคาร์บอนตัวที่ 1 ที่เป็นหมู่อัลดีไฮด์กับคาร์บอนตัวที่ 5 ที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล เขียนเป็นโครงสร้างแบบเก้าอี้ได้ 2 แบบ คือ รูปแอลฟาและเบต้า ดังนี้



β-D(+)-กลูโคส
หรือ β-D(+)-กลูโคไพราโนส



α-D(+)-กลูโคส
หรือ α-D(+)-กลูโคไพราโนส

กลูโคสในสภาพสารละลายจะอยู่ทั้งในรูปแอลฟา และ เบต้า เช่น เมื่อละลาย D(+)-กลูโคสในน้ำ ค่ามุมการหมุนระนาบแสงจะลดลง เนื่องจากเกิด mutarotation ระหว่างรูปแอลฟาและเบต้าจนถึงสมดุล จะมีกลูโคสอยู่ในรูปของเบต้าประมาณ 62 เปอร์เซนต์ แอลฟาประมาณ 38 เปอร์เซนต์ และกลูโคสในรูปอัลดีไฮด์ช้างต้นประมาณ 0.003 เปอร์เซนต์ พบว่าอัตราส่วนนี้จะไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงแม้อุณหภูมิและความเข้มข้นจะเปลี่ยนไป กลูโคสรูปเบต้าจะละลายได้ดีกว่ารูปแอลฟา ดังปรากฏในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกลูโคส (4)

คุณสมบัติทางกายภาพ	α-D-กลูโคส	α-D-กลูโคสโมโนไฮเดรท	β-D-กลูโคส
จุดหลอมเหลว °ซ	146	83	150
การละลาย ที่ 25 °ซ (กรัม/100กรัมสารละลาย)	62→30.2→51.2	30.2→51.2	72→51.2
มุมการหมุนระนาบแสง $[\alpha]_D^{20}$	112.2→52.7	112.2→52.7	18.7→52.7

→ แสดงการเปลี่ยนแปลงจากจุดเริ่มต้นจนถึงจุดสมดุลของสารละลาย

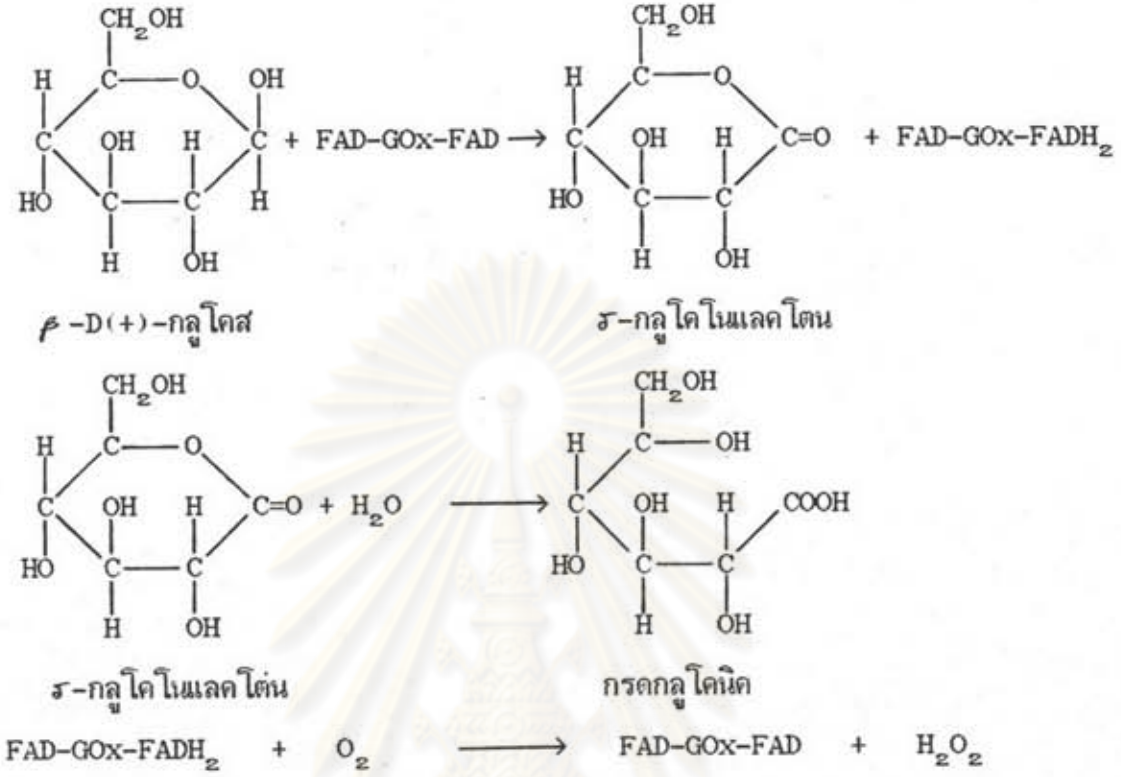
4. เอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส

เอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส (E.C.1.1.3.4) (6;7) ใช้คำย่อ GOx แทน เป็นเอนไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน β-D(+)-กลูโคสโดยมีออกซิเจนอยู่ด้วยให้เป็นกรดกลูโคนิคและไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ ดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 + H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_7 + H_2O_2$$

GOx ส่วนมากได้จากเชื้อรา Aspergillus niger เป็นส่วนใหญ่ อาจได้จากเชื้อ Penicillium notatum และ Penicillium amagasakiense GOxเป็นไกลโคโปรตีนมีคาร์โบไฮเดรทประมาณ 16 เปอร์เซนต์ GOxที่ได้จาก A. niger เป็นไดเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 186,000 มีโคเอนไซม์คือ flavine adenine dinucleotide (FAD) 2 โมลต่อไดเมอร์ติดอยู่อย่างแน่นหนากับเอนไซม์ GOxจาก P. amagasakiense ก็มีลักษณะเหมือนกัน แต่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160,000 GOxมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือ พีเอช 5.6 ช่วงพีเอชที่ใช้งานได้คือ พีเอช 2 ถึง 8 พบว่าเอนไซม์จะเสียเสถียรภาพที่พีเอชมากกว่า 8 เช่น ที่พีเอช 8.1 เอนไซม์จะเหลือแอคติวิตีเพียง 10 เปอร์เซนต์เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที และอัตราการสูญเสียจะเร็วมากขึ้นที่พีเอช 9 แต่ถ้ามีกลูโคสอยู่ด้วยจะช่วยให้มีเสถียรภาพดีขึ้นบ้าง ที่อุณหภูมิ 40 °ซ พีเอช 3.5 ถึง 7 GOx ยังมีเสถียรภาพดี แต่ถ้าอุณหภูมิมากกว่า 40 °ซ GOx จะไม่ค่อยมีเสถียรภาพ ที่อุณหภูมิ 50 °ซ GOx จะไม่มีเสถียรภาพเลย และจะสูญเสียแอคติวิตีภายใน 2-3 นาทีที่อุณหภูมิ 65 °ซ การเพิ่มอุณหภูมิจะลดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำซึ่งให้ผลตรงข้ามกับการเพิ่มแอคติวิตีเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในช่วงหนึ่ง พบว่า GOx มีแอคติวิตีเปลี่ยนเล็กน้อยในช่วงอุณหภูมิ 15 ถึง 40 °ซ

GOx จะช่วยเร่งปฏิกิริยาการส่งผ่านไฮโดรเจนอะตอมจากกลูโคสไปยังออกซิเจน และจากการศึกษาด้วยโพลาริมิเตอร์พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของ GOx คือ δ-กลูโคโนแลคโตน และจะเกิดไฮโดรไลซิสต่อไปได้ กรดกลูโคนิค ดังนั้นสับสเตรทของ GOx คือ กลูโคสแบบไพราโนส



ดังนั้นอาจเรียกชื่อ GOx ว่า β-D-กลูโคไพราโนส ออกซิเดส หรือ β-D-กลูโคไพราโนส แอโรดีไฮโดรจีเนส หรือ อาจจัดเป็น oxygen facultative two-electron transfer enzyme ตามสมการดังนี้

$$\beta\text{-D-กลูโคไพราโนส} \longrightarrow \delta\text{-D-กลูโคโนแลคโตน} + 2e^- + 2H^+$$

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

GOx สามารถใช้ตัวรับไฮโดรเจนตัวอื่นแทนออกซิเจนได้ เช่น 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล แต่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพียง 3.3 เปอร์เซนต์ของออกซิเจน

GOx มีความจำเพาะเจาะจงสูงมากกับ β-D(+)-กลูโคส อัตราการเกิดปฏิกิริยาของ β-D(+)-กลูโคสเทียบกับ ∝-D(+)-กลูโคส ประมาณ 157 เท่า ดังปรากฏในตารางที่ 1.2 GOx มีค่า K_m แตกต่างกันตามแหล่งที่ได้ ดังปรากฏในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.2 อัตราการเกิดปฏิกริยากับออกซิเจนโดยกลูโคสออกซิเดสของ β-D(+)-กลูโคส เทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น(8)

สับสเตรท	อัตราการเกิดปฏิกริยาสัมพัทธ์
β-D-Glucose	100
2-Deoxy-D-glucose	25
6-Deoxy-6-fluoro-D-glucose	3
6-Methyl-D-glucose	2
4,6-Dimethyl-D-glucose	1
D-Mannose	1
D-Xylose	1
α-D-Glucose	0.6
Trehalose	0.3
น้ำตาลอื่น ๆ อีก 80 ชนิด	0.0

ตารางที่ 1.3 ค่า Michaelis constant (K_m) ของ GOx (8)

แหล่ง	สับสเตรท	K_m (mM)	สภาวะที่ใช้วัด
P. notatum	กลูโคส	9.6	พีเอช 5.6,25 °ซ
A. niger	กลูโคส	33.0	พีเอช 5.6,25 °ซ
	ออกซิเจน	0.2	พีเอช 5.6,25 °ซ

5. การวัดปริมาณกลูโคสด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรด

การตรึง GOx สำหรับทำเอนไซม์อิเล็กโทรดวัดหาปริมาณกลูโคสมีเทคนิคหลายแบบ เช่น

Guilbault และ Lubrano (9) ตรึง GOx ร่วมกับโบวีน เซรุม อัลบูมินโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารไบฟังชันแนล เทบนแผ่นกระจก ได้เป็นเอนไซม์เมมเบรน แล้วติดบนอิเล็กโทรดแพลตินัม วัดไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น

Koyama (10) ใช้เซลลูโลส ไตรอะซิเตต กลูตารัลดีไฮด์ และ 1,8-ไดอะมิโน-4-อะมิโนเมทิลออกเทนทำเป็นเมมเบรน นำมาติดหมู่อะมิโนอิสระที่เหลือของเมมเบรนอีกครั้งด้วยกลูตารัลดีไฮด์ แล้วจึงตรึง GOx เข้ากับหมู่อัลดีไฮด์อิสระที่เหลือของกลูตารัลดีไฮด์ ได้เมมเบรนที่บาง ฉีกขาดง่าย จึงต้องป้องกันด้วยเซลลูโลส ไดอะซิเตตอีกชั้นภายนอกเมื่อนำไปติดบนอิเล็กโทรดปรากฏว่าให้เวลาแสดงสัญญาณสิ้นดี เพียง 10 วินาที

Kulys (11) ตรึง GOx ร่วมกับเปอร์ออกซิเดส โดยใช้โบวีน เซรุม อัลบูมิน และกลูตารัลดีไฮด์ แล้วเทบนแผ่นกระจกได้เอนไซม์เมมเบรน นำมาติดบนอิเล็กโทรดคาร์บอนใช้วัดในสารละลายที่มีเฮกซาไซยาโนเฟอเรต(II) โดยตั้งความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 0.0 โวลต์ เทียบกับ Ag/AgCl/saturated KCl เพื่อป้องกันสารอินทรีย์อื่นในของเหลวของร่างกายซึ่งอาจถูกออกซิไดส์ได้ที่ศักย์ไฟฟ้าสูงและรบกวนผลการวัด

Coulet (12) นำฟิล์มคอลลาเจนมาทำ acyl azide activation ที่หมู่คาร์บอกซิลของฟิล์มคอลลาเจน แล้วจึงทำปฏิกิริยากับ GOx ได้เป็นเอนไซม์เมมเบรน ติดบนอิเล็กโทรดแพลตินัม วัดไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น

โดยทั่วไปแล้ววิธีเหล่านี้มีลักษณะตามต้องการในการทำเอนไซม์อิเล็กโทรด แต่เมมเบรนที่ตรึงได้มักฉีกขาดง่ายเมื่อมีการติดและถอดเมมเบรนหลายครั้งขณะที่ต้องการวัดหรือเก็บเมมเบรนไว้ที่อุณหภูมิต่ำหลังเลิกใช้งานแล้ว นอกจากนี้เทคนิคและสารเคมีต่างๆยังยุ่งยากและมีราคาแพง ผลการตรึงที่ได้ไม่สม่ำเสมอ บางครั้งตรึงได้ดีเอนไซม์มีแอคติวิตีสูง บางทีก็ได้ผลไม่ค่อยดี

Hornby และ Morris (13) ตรึง GOx บนผิวภายในท่อไนลอนดังนี้

1. นำท่อไนลอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1 มิลลิเมตร ยาว 3 เมตร มากระตุ้นด้วยไดเมทิล ซัลเฟต

2. ทำปฏิกิริยากับไลซีน หรือ เฮกซาเมทิลีนไดอามีน

3. ทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ และ GOx ตามลำดับ

ต่อท่อไนลอนที่ตรึงเอนไซม์แล้วกับ automated analysis system วัดปริมาณกลูโคสโดยให้ไหลผ่านในท่อแล้ววัดปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น หรือ ปริมาณออกซิเจนที่ลดลง การวัดปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นให้ทำปฏิกิริยากับ acid/KI แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 349 นาโนเมตร ส่วนออกซิเจนวัดโดยใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรด

Mascini (14) ตรึง GOx บนผ้าไนลอนตามวิธีของ Hornby และ Morris โดยใช้ไลซีน กลูตารัลดีไฮด์ และ GOx ตามลำดับ แล้วนำผ้าที่ตรึงเอนไซม์มาติดบนออกซิเจนอิเล็กโทรดวัดปริมาณกลูโคส การใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรดมีข้อดี คือ ช่วยป้องกันสารรบกวนไปเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วอิเล็กโทรดได้ด้วยเมมเบรนเทฟลอนที่ปิดบนผิวอิเล็กโทรดแพลตินัม แต่มีข้อจำกัด คือ มี sensitivity ต่ำ เพราะการละลายของออกซิเจนในน้ำมีน้อย(ดูภาคผนวก ก) ดังนั้นการวัดปริมาณออกซิเจนที่ลดลงเมื่อเกิดปฏิกิริยาจึงวัดได้น้อย ไม่สามารถวัดปริมาณกลูโคสต่ำๆได้

การเลือกใช้ไนลอนมีข้อดีหลายข้อ (15) คือ ไนลอนมีเสถียรภาพเชิงกลดี ไม่ฉีกขาดง่าย ไม่ถูกย่อยสลายโดยทางชีวภาพ โครงสร้างของไนลอน 6 และ ไนลอน 6,6 มีคุณสมบัติค่อนข้างจะชอบน้ำ (hydrophilic) ช่วยทำให้เอนไซม์ที่ตรึงได้มีเสถียรภาพดีขึ้น การตรึงเอนไซม์ตามวิธีของ Hornby และ Morris เกิดปฏิกิริยาแบบ O-Alkylation โดยใช้ไดเมทิล ซัลเฟต จะไม่มีการทำลายหมู่ชะในโพลีเมอร์ของไนลอน ผ้าที่ได้จึงมีเสถียรภาพเชิงกลดีเหมือนเดิม สามารถใช้และเก็บไว้ได้หลายครั้ง ลักษณะผ้าไนลอนมีรูพรุนในแต่ละเส้นด้ายประกอบด้วยเส้นใยของไนลอนเล็ก ๆ อีกมากมาย เพิ่มพื้นที่ผิวในการตรึงเอนไซม์และปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ช่วยทำให้เวลาแสดงสัญญาณเร็ว มีแอคติวิตีสูง การตรึงวิธีนี้เป็นแบบเกิดหมู่ชะโคเวเลนต์บนผ้าไนลอน เอนไซม์จะถูกตรึงอย่างถาวร ช่วยเพิ่มอายุการใช้งาน ลักษณะการถูกตรึงของเอนไซม์ไม่รุนแรง เมื่อเทียบกับการเชื่อมโยงเอนไซม์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์โดยตรงซึ่งอาจทำให้รูปร่างเอนไซม์เปลี่ยนไปได้มาก การมีโมเลกุลของไลซีน

หรือ เฮกซาเมทิลีนไดอามีนและกลูตารัลดีไฮด์เชื่อมระหว่างเอนไซม์กับพื้นผิวของไนลอน ช่วยทำให้เอนไซม์ไม่ติดกับพื้นผิวของไนลอนเกินไปจนอาจเกิดการกีดกันโมเลกุลของสับสเตรทเข้าไปไม่ถึงบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ได้

สำหรับงานวิจัยนี้ จะทำการดัดแปลงอุปกรณ์วิเคราะห์กลูโคส เนื่องจากมีเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสอยู่แล้ว เป็นเครื่อง YSI Glucose Analyser ประกอบด้วย มิเตอร์และอิเล็กโทรดที่ใช้วัดปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ มีแพลตินัมเป็นขั้วอาโนด เงินเป็นขั้วคาโทด ตามรูปที่1.2 ใช้ความต่างศักย์ 0.7 โวลต์ระหว่าง 2 ขั้ว อิเล็กโทรดไม่มีความจำเพาะเจาะจงสามารถออกซิไดส์สารอื่นได้ เช่น กรดแอสคอบิค กรดยูริค ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่อิเล็กโทรด เป็นดังนี้

ขั้วอาโนด แพลตินัม $H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$

ขั้วคาโทด เงิน $2e^- + 2H^+ + 1/2O_2 \longrightarrow H_2O$

ที่ชั้นเอนไซม์ กลูโคส + O_2 + H_2O $\longrightarrow$ กรดกลูโคนิค + H_2O_2

เมื่อกลูโคส 1 โมลทำปฏิกิริยากับ GOx จะเกิดไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ 1 โมล ออกซิเจนจะทำปฏิกิริยาที่ขั้วคาโทดเสียออกซิเจนครึ่งโมล ปฏิกิริยารวมจะเป็นดังนี้

กลูโคส + $1/2O_2$ $\longrightarrow$ กรดกลูโคนิค

เดิมใช้การตรึงเอนไซม์บนผิวอิเล็กโทรด ดังนี้

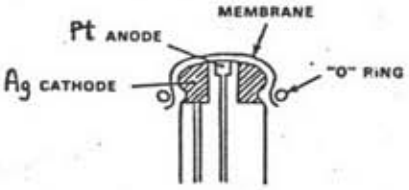
1. ตักผงเอนไซม์ปริมาณน้อย ๆ ลงบนผิวอิเล็กโทรดตรงกลางบริเวณขั้วแพลตินัม

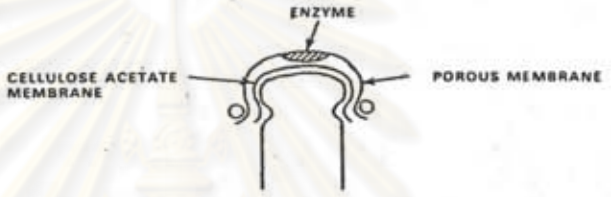
2. หยดน้ำให้เอนไซม์พอเปียก เกลี่ยให้ทั่วบนผิวอาโนดเป็นชั้นบาง ๆ แล้วปล่อยทิ้งให้แห้ง

3. ปิดทับผิวอิเล็กโทรดที่มีเอนไซม์ด้วยเมมเบรนคอลลาเจน ใช้วงยางช่วยรัดเมมเบรนกับอิเล็กโทรด

4. ในกรณีที่ต้องการป้องกันสารรบกวนที่อาจถูกออกซิไดส์ได้ที่อาโนด อาจใช้เมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตตอีกชั้นหนึ่งติดก่อน ให้อยู่ระหว่างผิวอิเล็กโทรดกับเอนไซม์

5. เปิดสวิทช์เครื่อง จุ่มอิเล็กโทรดที่ตรึงเอนไซม์แล้วในสารละลายบัฟเฟอร์ รอให้โพรบที่ตรึงได้เสถียร รอประมาณ 3 ชั่วโมงจึงใช้งาน





รูปที่ 1.2 ขั้วคาโทดและอาโนดของ H_2O_2 อิเล็กโทรดและการตรึงเอนไซม์บนผิวอิเล็กโทรด

แม้ว่าวิธีดังกล่าวให้ผลดีนอสมควร แต่ผู้ใช้ต้องมีความชำนาญในการตรึงเอนไซม์ให้พอเหมาะ ไม่มากเกินไป หรือ น้อยเกินไป และต้องให้เอนไซม์กระจายตัวสม่ำเสมอบนผิวอิเล็กโทรด วิธีนี้ต้องใช้เวลานานในการ calibrate เครื่องก่อนที่จะใช้ได้ นอกจากนั้นฟิล์มคอลลาเจนจะถูกย่อยสลายทางชีวภาพเมื่อติดไว้ข้ามวัน ทำให้เสียเสถียรภาพทางกล ดังนั้นการใช้งานจึงต้องตรึงเอนไซม์ใหม่ทุกวันซึ่งในการตรึงแต่ละครั้งใช้เวลานาน และยังเป็นการสูญเสียเอนไซม์อีกด้วย จากความไม่สะดวกและไม่ประหยัดดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมองหารูปแบบการตรึงเอนไซม์แบบอื่นทดแทน ได้เลือกวิธีการตรึงเอนไซม์บนผ้าไนลอน เพราะข้อดีต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นของผ้าไนลอน เทคนิคที่ใช้ก็ใช้วิธีเกิดปฏิกิริยา O-Alkylation ด้วยไดเมทิล ซัลเฟต ตามแบบของ Hornby และ Morris เลือกเฮกซาเมทิลีนไดอามีนแทนไลซีน เพราะราคาถูกกว่า แล้วทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ และ GOx ตามลำดับ นำผ้าไนลอนที่ตรึงเอนไซม์มาติดบนไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์อิเล็กโทรดดังกล่าว คาดว่าจะวัดปริมาณกลูโคสต่ำๆ ได้ดีกว่าวิธีของ Mascini (14) ที่ใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรด ในกรณีที่ต้องการวัดหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างที่มีสารรบกวนสามารถทำได้โดยการใช้เมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตตติดบนอิเล็กโทรดก่อนติดผ้าไนลอน ซึ่งจะยอมให้เฉพาะสารโมเลกุลเล็ก เช่น ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ผ่านเข้าไปได้เท่านั้น

013806