4

การตรึงกลูโคสออกซิเดสบนผ้าไนลอนสำหรับวัดกลูโคสด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรด

นาย ประกอบ กิจไชยา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

ISBN 974-568-588-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013806

I10300207

Immobilization of Glucose Oxidase on Nylon Cloth for Determining Glucose with Enzyme Electrode

Mr. Prakob Kitchaiya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Biotechnnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-568-588-7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรึงกลูโคสออกซิเดสบนผ้าไนลอนสำหรับวัดกลูโคสด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรด
โดย	นาย ประกอบ กิจไชยา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นมานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประกอบ กิจไชยา : การตรึงกลูโคสออกซิเดสบนผ้าไนลอนสำหรับวัดกลูโคสด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรด(Immobilization of Glucose Oxidase on Nylon Cloth for Determining Glucose with Enzyme Electrode)

อ.ที่ปรึกษา:ผศ.ดร.สุรนงค์ นวังคสัตถุศาสน์

วิธีวัดกลูโคสมีหลายวิธี แต่ละวิธีมีจุดอ่อนแตกต่างกัน เช่น ให้ผลไม่ค่อยถูกต้อง ดูจุดยุติยาก ไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับกลูโคส ยุ่งยาก สิ้นเปลือง การใช้เอนไซม์อิเล็กโทรดจะช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ แต่เทคนิคการตรึงเอนไซม์ยังไม่สะดวก เสียเวลา เปลืองเอนไซม์ และอายุการใช้งานสั้น จึงต้องการหาเทคนิคใหม่ในการตรึงเอนไซม์ที่ดีขึ้นและศึกษาสภาวะการใช้งานของเอนไซม์ที่ตรึงได้ การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ กระตุ้นผ้าไนลอน ติดด้วยเฮกซาเมทิลีนไดอามีน ติดด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และเอนไซม์ ตามลำดับ ศึกษาปัจจัยต่างๆในแต่ละขั้นตอน คือ ความเข้มข้น พีเอช และเวลาที่ใช้ติด โดยวางแผนการทดลองแบบ 2^3 แฟกตอเรียลได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ กระตุ้นด้วยไดเมทิลซัลเฟต 5 นาที ติดด้วยเฮกซาเมทิลีนไดอามีนเข้มข้น 1% พีเอช9 เวลา45นาที ติดกลูตารัลดีไฮด์เข้มข้น 1% พีเอช9 เวลา45นาที และตรึงเอนไซม์กลูโคส ออกซิเดสเข้มข้น 0.3 % พีเอช9 เวลา2ชั่วโมง เอนไซม์ที่ตรึงได้สามารถใช้งานได้ที่อุณหภูมิ 25 °ซ ถึง 45 °ซ และช่วงพีเอชที่เหมาะสม คือ พีเอช6.5ถึง7 มีพลังงานกระตุ้นในการวัดกลูโคส คือ 5.7 Kcal/mole เอนไซม์มีเวลาครึ่งอายุ 11 และ 6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 °ซ เอนไซม์มีเสถียรต่อพีเอชในช่วง6ถึง7 ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 °ซเอนไซม์จะเสียแอคติวิตีไปมากภายในเวลา 2-3 นาที มีพลังงานกระตุ้นในการทำลายเอนไซม์คือ 26.4 Kcal/mole มีค่า K_m คือ 7.4 มิลลิโมลาร์ V_{max} คือ 1 ไมโครโมล/นาที สามารถใช้วัดปริมาณกลูโคสได้ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 150 ppm ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตพีเอช7 เมื่อวัดตัวอย่าง 15 ครั้งมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 1.7% มีเวลาแสดงสัญญาณประมาณ 1 ถึง 2 นาที เมื่อใช้เอนไซม์ตรึงบนผ้าไนลอนพร้อมกับแผ่นเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตต สามารถวัดปริมาณกลูโคสได้ดี มีสัญญาณเรียบขึ้น ช่วยป้องกันสารรบกวนได้ พบว่าไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น 99 %จะเคลื่อนที่กลับมาในเนื้อสารละลาย อีก 1 % ทำปฏิกิริยาเกิดสัญญาณที่ขั้วอิเล็กโทรด ในขณะวัดกลูโคสเข้มข้น150ppm ออกซิเจนที่ละลายอยู่ลดลง 0.36 % และการวัดกลูโคสโดยใช้ออกซิเจนอิเล็กโทรดให้ sensitivity ต่ำ เมื่อใช้วัดด้วยอุปกรณ์ควบคุมการผสมสามารถอ่านสัญญาณได้ง่ายขึ้น การใช้งานสะดวกสบาย และใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย สภาวะที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์ตรึงบนผ้าไนลอน คือ เก็บในสารละลาย 0.1 % โซเดียมเบนโซเอทในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2530 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

PRAKOB KITCHAIYA : IMMOBILIZATION OF GLUCOSE OXIDASE ON NYLON CLOTH FOR DETERMINING GLUCOSE WITH ENZYME ELECTRODE. THESIS ADVISOR : ASS. PROF. SURAPONG NAVANKASATTUSAS, Ph.D.

There are several methods for glucose determination. Each method provides different type of deficiencies i.e. low accuracy, unclear end point, having non-specific reaction with glucose, complicate or expensive. Determination with enzyme electrode may alleviate these problems. The conventional technique of enzyme immobilization is still rather inconvenient namely, time consuming and short working life-time. Better technique for the enzyme immobilization and determining appropiate condition of its application is therefore necessary to be developed. Appropiate condition for glucose oxidase immobilization were carried out as follows: The nylon cloth was activated. Then, hexamethylenediamine, glutaraldehyde and glucose oxidase were attached to the activated cloth respectively. The effects of concentration, pH and time intervals of immobilization were investigated throughout the experiments. The experiments were designed according to 2^3 factorial model. The optimal condition is as follows: The nylon cloth is activated by dimethyl sulfate for 5 min., then, treated with 1% hexamethylenediamine at pH9 for 45 min., 1% glutaraldehyde at pH9 for 45 min. and 0.3% glucose oxidase at pH7 for 2hrs. The immobilized enzyme can be used in the temperature range from 25 °c to 45 °C and optimum pH is 6.5 to 7. The activation energy is 5.7 Kcal./mole. The halflife of enzyme is 11 and 6 days at 30 and 40 °C respectively. pH stability of the enzyme ranges from 6 to 7. When temperature is above 50 °C, the enzyme loses its activity within 2 to 3 min. The inactivation energy is 26.4 Kcal./mole. Km is 7.4 mM. Vmax is 1 umole/min. The recommended concentration for glucose determination ranges from 0 to 150 ppm in phosphate buffer at pH 7.0. The relative standard deviation was 1.7 % from determination of 15 replicates. The response time is approximately 1 to 2 min. Using the immobilized enzyme on nylon cloth with cellulose acetate membrane can detect glucose content well. The signals are smoother. It prevents interfering chemical substances. Ninety nine percent of occuring H_2O_2 dissolves in the solution and only 1 % of H_2O_2 reacts at the electrode with resulting signals. During glucose determination at 150 ppm, dissolve oxygen content decreases only 0.36 %. Determining glucose with oxygen electrode gives low sensitivity. When a mixing cell is used, it is easier to read the signal and the glucose determination is more convenient which requires only a small sample size. Optimum condition to preserve this immobilized enzyme is storage in 0.1% sodium benzoate in phosphate buffer pH 7.0 at 4 °C.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ .....

ปีการศึกษา 2530 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ อาจารย์ได้กรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษาตลอดจนอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ได้กรุณาอนุญาตให้ใช้สถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมี จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณ บริษัท ไว้ท์กรุ๊ป จำกัด ได้เอื้อเฟื้อให้ผงเซลลูโลสอะซีเตต

ขอขอบคุณ คุณสมพร เอี่ยมสำอางค์ เจ้าหน้าที่ศูนย์พัฒนาและบริการทางเครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ช่วยเหลือจัดสร้างอุปกรณ์ควบคุมการผสม

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์บริการ ที่ได้ให้ความรู้และความช่วยเหลือต่าง ๆ

ขอขอบคุณ ชาวเทคโนโลยีชีวภาพ และ ชาววิทยาศาสตร์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าด้วยดี

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณแม่ และ ญาติพี่น้องที่ได้ช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ ความดีใด ๆ ในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ข้าพเจ้าขอมอบแด่แม่ ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นทั้งหมดข้าพเจ้าขอยอมรับเป็นความเขลาของข้าพเจ้าแต่ผู้เดียว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ฑ

คำย่อและสัญญลักษณ์ ..... ด

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 16

บทที่ 3 ผลการวิจัย 25

บทที่ 4 วิจารณ์ผลและบทสรุป 60

เอกสารอ้างอิง 64

ภาคผนวก 67

ประวัติผู้เขียน 78

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	คุณสมบัติทางกายภาพของกลูโคส	8
1.2	อัตราการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนโดย GOx ของ β-D(+)-กลูโคส เทียบกับของน้ำตาลอื่น	11
1.3	ค่า Michaelis constant (K_m) ของ GOx	11
3.1	ผลการกระตุ้นผ้าไนลอนด้วยไดเมทิล ซัลเฟตที่เวลาต่าง ๆ กัน	25
3.2	ผลการติดเฮกซาเมทิลีนไดอามีนในสภาวะต่าง ๆ	26
3.3	ผลของปัจจัยต่างๆในการติดเฮกซาเมทิลีนไดอามีน	26
3.4	ผลการติดเฮกซาเมทิลีนไดอามีนที่ระดับความเข้มข้นและเวลาน้อยลง	28
3.5	ผลของปัจจัยต่างๆในการติดเฮกซาเมทิลีนไดอามีนที่ระดับความเข้มข้นและเวลาน้อยลง	28
3.6	ผลการติดกลูตารัลดีไฮด์ ในสภาวะต่าง ๆ	29
3.7	ผลของปัจจัยต่างๆในการติดกลูตารัลดีไฮด์	29
3.8	ผลการติดกลูตารัลดีไฮด์ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาน้อยลง	30
3.9	ผลของปัจจัยต่างๆในการติดกลูตารัลดีไฮด์ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาน้อยลง	30
3.10	ผลการตรึง GOx ในสภาวะต่าง ๆ	31
3.11	ผลการวัดสารรบกวนเมื่อมีแผ่น CA และผ้าไนลอน	47
3.12	ผลการวัดสารรบกวนเมื่อไม่มีแผ่น CA มีแต่ผ้าไนลอน	47
3.13	ผลของระดับขนาดปฏิกิริยาที่เกิด H_2O_2 ขณะวัดกลูโคส	48
3.14	เสถียรภาพในการเก็บผ้าไนลอนตรึง GOx ที่พีเอชต่าง ๆ	53
3.15	เสถียรภาพในการเก็บผ้าไนลอนตรึง GOx ที่อุณหภูมิห้อง	57
3.16	เสถียรภาพในการเก็บผ้าไนลอนตรึง GOx ที่อุณหภูมิ 4 °ซ	57
4.1	ค่า D (diffusivity) ของกลูโคสที่อุณหภูมิต่างๆ	61

ตารางที่ หน้า

ก. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ 67

ข. ผลการติดกลูตารัลดีไฮด์ ในสภาวะต่างๆ และคำนวณผลรวมของซ้ำ 70

ค. ผลการคำนวณหาค่า mean effect ของการติดกลูตารัลดีไฮด์ 71

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	รูปแบบเอนไซม์อิเล็กโทรดและปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นที่ผิวอิเล็กโทรด	5
1.2	ชั้วคาโทดและอาโนดของ H_2O_2 อิเล็กโทรดและการตรึงเอนไซม์บนผิวอิเล็กโทรด	15
2.1	การวัดแอคติวิตีเอนไซม์ตรึงบนผ้าไนลอนด้วยเครื่อง YSI Glucose Analyser	20
2.2	รูปถ่ายอุปกรณ์ควบคุมการผสม	23
2.3	แบบแสดงโครงสร้างอุปกรณ์ควบคุมการผสม	24
3.1	ผลของพีเอชที่มีต่อผลการวัดปริมาณกลูโคส	32
3.2	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อผลการวัดปริมาณกลูโคส (ช่วงอุณหภูมิต่ำ)	34
3.3	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อผลการวัดปริมาณกลูโคส (ช่วงอุณหภูมิสูง)	35
3.4	ผลของพีเอชที่มีต่อเสถียรภาพของ GOx ตรึงบนผ้าไนลอน	36
3.5	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของ GOx ตรึงบนผ้าไนลอนขณะใช้งาน	37
3.6	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยากับความเข้มข้นกลูโคส	38
3.7	กราฟ Lineweaver-Burk ของ GOx ตรึงบนผ้าไนลอน	39
3.8	ผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคสที่มีต่อผลการวัดปริมาณกลูโคสเมื่อใช้แผ่น CA หนา 35 ไมโครเมตร	41
3.9	ผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคสที่มีต่อผลการวัดปริมาณกลูโคสเมื่อใช้แผ่น CA หนา 25 ไมโครเมตร	42
3.10	เหมือนรูปที่ 3.9 แต่ขยายสเกลดูสัญญาณในช่วงนาทีแรก	42
3.11	ผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคสที่มีต่อผลการวัดปริมาณกลูโคสและแสดงเวลาที่ใช้ในการล้าง H_2O_2 ก่อนเข้าสู่ค่าศูนย์	43
3.12	ผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคสที่มีต่อผลการวัดปริมาณกลูโคสเมื่อใช้แผ่น CA หนา 40 ไมโครเมตร	43

รูปที่ หน้า

3.13	ผลของการกวนที่มีต่อผลการวัดปริมาณกลูโคส	44
3.14	ผลของความเร็วรอบการกวนที่มีต่อผลการวัดปริมาณกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกันวัด 2 ครั้ง	45
3.15	ผลของการกวนที่ความเร็วรอบระดับ 4 ต่อผลการวัดปริมาณกลูโคส	46
3.16	ผลของการกวนที่ความเร็วรอบระดับ Ø.5 ต่อผลการวัดปริมาณกลูโคส	46
3.17	ผลการใช้แผ่น CA ป้องกันสารรบกวน	47
3.18	ผลการวัดปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์เมื่อใช้อิเล็กโทรดเปล่า ๆ	49
3.19	ผลการวัดปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์เมื่อใช้อิเล็กโทรดติดด้วยผ้าไนลอน	49
3.2Ø	ผลการวัดปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์เมื่อใช้อิเล็กโทรดติดด้วยแผ่น CA	50
3.21	ผลการวัดปริมาณไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์เมื่อใช้อิเล็กโทรดติดด้วยแผ่น CA และผ้าไนลอน	50
3.22	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำกับความเข้มข้นกลูโคส	52
3.23	ผลการวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้อุปกรณ์ควบคุมการผสม	54
3.24	ผลการวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้อุปกรณ์ควบคุมการผสมเมื่อใช้แรงลมกระทุ้งปานกลาง	55
3.25	ผลการวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้อุปกรณ์ควบคุมการผสมเมื่อใช้แรงลมกระทุ้งเบา	55
3.26	ผลการวัดปริมาณกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่ำโดยใช้อุปกรณ์ควบคุมการผสมเมื่อใช้แรงลมกระทุ้งเบาและกลาง	56
3.27	ผลการวัดปริมาณกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่ำโดยใช้อุปกรณ์ควบคุมการผสมเมื่อใช้แรงลมกระทุ้งแรงและเบา	56
3.28	ผลการวัดสารรบกวนโดยใช้อุปกรณ์ควบคุมการผสม	56
3.29	เสถียรภาพต่อพีเอชในการเก็บผ้าไนลอนตริง GOx ที่อุณหภูมิ 4 °ซ	58
3.3Ø	เสถียรภาพต่ออุณหภูมิในการเก็บผ้าไนลอนตริง GOx ที่พีเอช 7	59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ หน้า

4.1 รูปแบบและปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นที่ฟิล์มของเหลวบางระหว่างผ้าไนลอนกับเนื้อสารละลาย 61

ก. สเปกตรัมอินฟราเรดของผ้าไนลอน 68

ข. สเปกตรัมอินฟราเรดมาตรฐานของเส้นใยไนลอน 69

ค. พลังงานกระตุ้นในการวัดกลูโคสด้วย GOx ตรึงบนผ้าไนลอน 74

ง. พลังงานกระตุ้นในการทำลาย GOx ตรึงบนผ้าไนลอน 76

จ. การเปรียบเทียบพลังงานกระตุ้นของการ diffuse กับการวัดกลูโคส 77

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อและสัญญลักษณ์

°ซ	=	องศาเซลเซียส
ลบ.ซม.	=	ลูกบาศก์เซนติเมตร
CA	=	เมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตต
GOx	=	เอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส
H_2O_2	=	ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์
M	=	โมลาร์
ppm	=	ส่วนในล้านส่วน
%	=	ร้อยละ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย