บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

เอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้แก่ ตรวจวัดสารประกอบฟีนอล (phenol) เช่น pyrogallol , catechol , hydroquinone, phytomelin ฯลฯ (Yang และคณะ,2006) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งเป็นอันตรายต่อร่างกาย (Gomez และคณะ,2006) โดยพบว่ามีการปนเปื้อนอยู่ในอาหารและยาปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น โรงงานพลาสติก โรงงานปิโตรเลียม โรงงานสบู่ผงซักฟอก ฯลฯ (Cheng และคณะ,2006 ; Lai และคณะ,2006) ดังนั้นจึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้มาประยุกต์ใช้ในงานไบโอเซนเซอร์(biosensor) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่มีส่วนประกอบของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสตรึงอยู่ในวัสดุต่างๆ ทั้งนี้เพื่อให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพและเสถียรภาพทั้งในด้านการทำงานและการเก็บรักษา

โดยในงานวิจัยที่ผ่านมามีการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การยึดด้วยพันธะโควาเลนต์ เช่น การตรึงกลูโคสออกซิเดสลงบนแมกนีเซียมซิลิเกท (magnesium silicate) (Ozyilmaz และคณะ,2005) การตรึงเอนไซม์ยูรีเอส (urease) ลงในไคโตซานพอลิไกลซิดิลเมททาไครเลท (chitosan-polyglycidyl methacrylate) (Chellapandian และKrishnan ,1997) เป็นต้น การครอสลิงค์ (cross-linking) เช่น การตรึงกลูโคสออกซิเดสลงบน Cellulose acetate-polymethyl methacrylate (Rauf และคณะ,2006) การตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสลงในไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนของโคบอลต์เฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (cobalt hexacyanoferrate nanoparticle) และคาร์บอนนาโนทิวบ์ (carbon nanotube)(Yang และคณะ,2005) เป็นต้น ซึ่งการตรึงเอนไซม์ทั้งสองวิธีนี้มีความแข็งแรงของการยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์กับวัสดุตรึงมาก แต่มีข้อเสียคือการเชื่อมเอนไซม์ด้วยสารเคมีของสองวิธีนี้ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ได้ จึงมีงานวิจัยที่ใช้วิธีการตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เพื่อช่วยลดปัญหาการหลุดออกของเอนไซม์และการเสื่อมสภาพของเอนไซม์จากสารเคมีที่เป็นพิษ เช่น การตรึงกลูโคสออกซิเดสลงในพอลิพิรอล (polypyrrole) (Ramanaricius และคณะ,2005) การตรึงเอนไซม์ไทโรซิเนส(tyrosinase) ในไคโตซาน(Wang และคณะ,2002) เป็นต้น นอกจากวิธีที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์จะเป็นส่วนสำคัญแล้ว การเลือกวัสดุที่จะใช้ในการตรึงก็มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เช่นกัน โดยจะเลือกใช้วัสดุที่มีความแข็งแรงไม่เปราะแตกหักง่าย สามารถยึดติดกับเอนไซม์ได้ดี ซึ่งในปัจจุบันพอลิเมอร์ธรรมชาติอย่างเช่น ไคโตซาน เป็นวัสดุที่ได้รับความนิยมสำหรับใช้ในการตรึงเอนไซม์เป็นจำนวนมาก (Taniai และคณะ, 2000 ; Sugawara และคณะ,2000 ; Miao และคณะ,2001 ; Zhu และคณะ, 2002 ; Zhou และคณะ,2002 ; Wang และคณะ,2003 ; Lei และคณะ, 2003)

ไคโตซาน(chitosan)เป็นวัสดุที่มีความสามารถในการยึดติดได้ดี มีความยืดหยุ่นได้เล็กน้อย เป็นวัสดุที่ขึ้นรูปได้ดีในการตรึงเอนไซม์ ไม่เป็นพิษ และมีราคาไม่แพง จึงมีการนำไคโตซานมาเป็นวัสดุในการตรึงเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ทำให้มีประสิทธิภาพและเสถียรภาพในการทำงานสูงกว่าเอนไซม์อิสระ (Cetinus และOztop,2000) ไคโตซานสามารถจะช่วยลดการเปราะหักของวัสดุประเภทเซรามิกซ์ (Yang และคณะ,2004) และซิลิก้า (Wang และคณะ,2003) นอกจากนี้ไคโตซานยังมีกลุ่มอะมิโนซึ่งสามารถยึดติดกับวัสดุประเภทอนุภาคนาโนได้ดี เช่น อนุภาคนาโนทองในไคโตซานที่ตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (Luo และคณะ,2005) ซึ่งอนุภาคนาโนที่ผสมลงไปจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาไปเป็นไบโอเซนเซอร์ที่มีคุณสมบัติไวต่อการตอบรับสัญญาณทำให้สามารถวิเคราะห์สารได้อย่างรวดเร็ว

อนุภาคนาโนของโลหะเป็นวัสดุตรึงอีกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนและนำไฟฟ้าได้ดี เช่น อนุภาคนาโนเงิน (silver nanoparticle) ซึ่งพบว่ามีการนำไฟฟ้าที่ดีกว่าอนุภาคนาโนทอง (gold nanoparticle) (Ren และคณะ,2003) นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาคนาโนเงินมีความสามารถในการยึดติดกับเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสได้ดี จึงช่วยป้องกันการหลุดออกของเอนไซม์จากวัสดุตรึงได้ดี (Luo และคณะ,2004) ทั้งนี้พบว่าอนุภาคนาโนเงินนั้นมีข้อดีทั้งด้านการตรึงเอนไซม์และด้านการนำไฟฟ้า จึงเหมาะแก่การนำไปเป็นองค์ประกอบของวัสดุในการตรึงเอนไซม์เพื่อพัฒนาต่อไปเป็นไบโอเซนเซอร์ที่มีคุณภาพ

เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการตรึงเอนไซม์ลงบนวัสดุตรึงที่มีการปรับปรุงด้วยวัสดุที่ช่วยในการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ดี พบว่าในด้านไบโอเซนเซอร์มีความไวต่อการตอบรับสัญญาณที่ดี แต่ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีค่าต่ำ (Qian และYang, 2006) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากในส่วนต้นของงานไบโอเซนเซอร์ที่เป็นการตรึงเอนไซม์ อาจมีการหลุดออกของเอนไซม์จากวัสดุตรึง จึงเป็นเหตุให้ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสแบบห่อหุ้มในวัสดุประกอบแต่งไคโตซานที่มีอนุภาคนาโนเงิน โดยจะมุ่งศึกษาเฉพาะในส่วนของการตรึงเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพและเสถียรภาพในการทำงานและการเก็บรักษา เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาต่อไปเป็นไบโอเซนเซอร์ที่มีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส ไคโตซาน และอนุภาคนาโนเงินต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูป ในแง่ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา เสถียรภาพในการทำงานและการเก็บรักษา

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสในวัสดุตรึงที่มีประสิทธิภาพจะทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ดี และมีเสถียรภาพการทำงานและการเก็บรักษาของเอนไซม์ได้นาน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานไบโอเซนเซอร์
2. จากข้อมูลที่ได้สามารถประยุกต์ใช้กับการตรึงเอนไซม์ชนิดอื่นเพื่อใช้ประโยชน์ในงานไบโอเซนเซอร์ด้านอื่นๆ

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

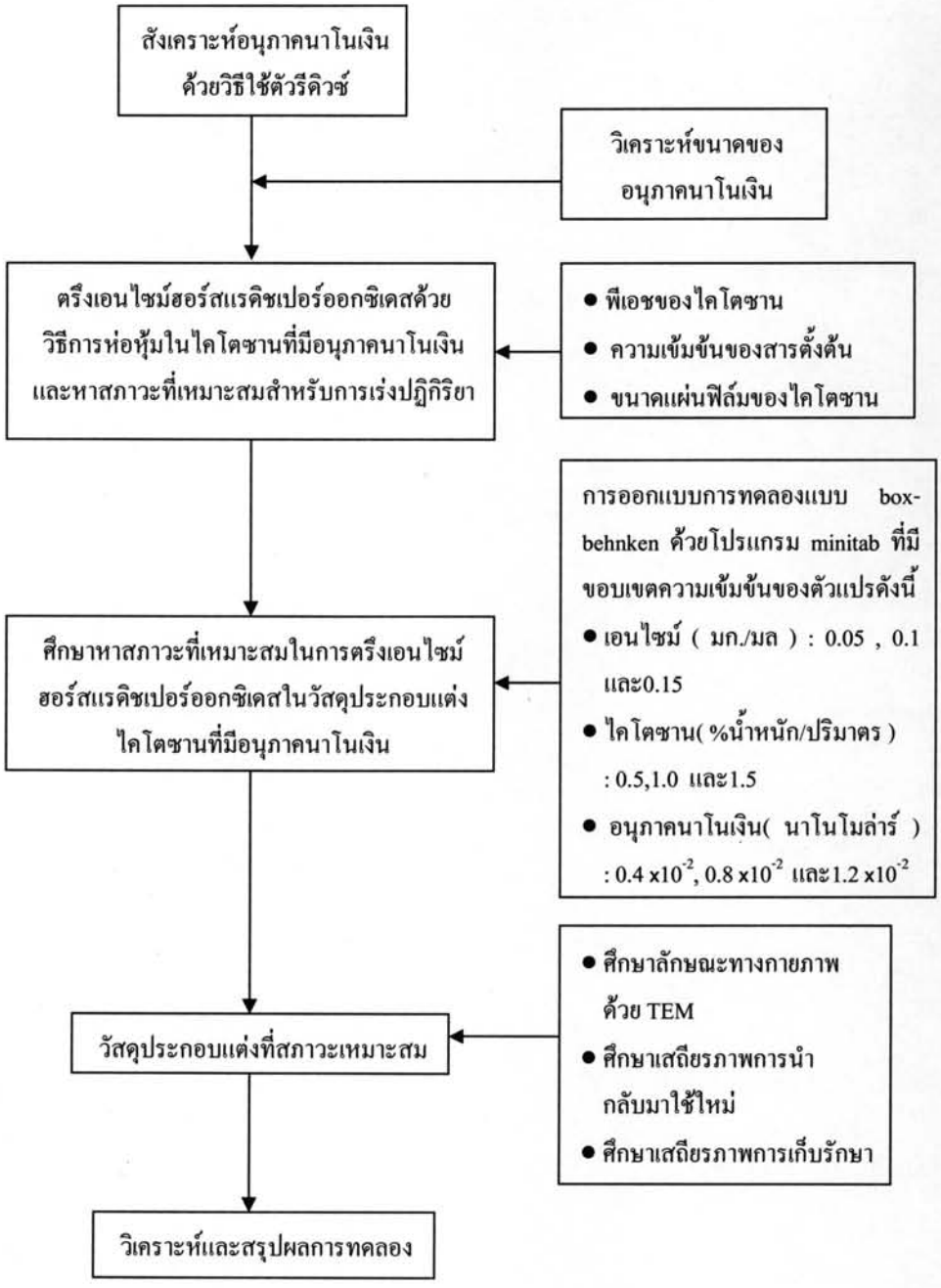
1. สังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินด้วยวิธีการใช้ตัวรีดิวซ์ (reducing agent) และทำการวิเคราะห์ขนาดและรูปร่างของอนุภาคที่ได้

2. ตรึงเอนไซม์ฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีการห่อหุ้มในวัสดุประกอบแต่งที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นขององค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

- ไคโตซาน 0.5 1.0 และ 1.5% น้ำหนัก/ปริมาตร
- อนุภาคนาโนเงิน 0.4×10^{-2} 0.8×10^{-2} และ 1.2×10^{-2} นาโนโมล่าร์
- เอนไซม์ 0.05 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

โดยใช้ระเบียบวิธีการออกแบบการทดลอง (experimental design) เพื่อหาอิทธิพลต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา เสถียรภาพในการทำงานและการเก็บรักษา ซึ่งจะมีแผนการดำเนินงานวิจัยดังที่แสดงในรูปที่ 1.1

3. การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำที่สภาวะพีเอช (pH) 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตรสุทธิที่ใช้ทดลอง 80 มิลลิลิตร และวัดค่าค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชั่นของไพโรแกลลอล (pyrogallol) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)



รูปที่ 1.1 แสดงแผนการดำเนินการวิจัย