การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 2

The 2nd STOU Graduate Research Conference

การเปรียบเทียบวิธีการตรึงรูปเอนไซม์เพื่อพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแล็กโทส

Comparison of Enzyme Immobilization Methods for the Development of Lactose Biosensor

สุวัฒนพงษ์ ทัพบุญมี (Suwattanapong Tupboonmi)* สายพิณ ทานัชฌาสัย (Saipin Thanachasai)**

โชคชัย ธีรกุลเกียรติ (Chockchai Theerakulkait)***

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้แสดงการเปรียบเทียบวิธีการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดส 2 วิธี บนลวดแพลินัมที่เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน

วิธีการตรึงรูปใช้วิธีการกักเก็บในอิเล็กโทรพอลิเมอไรซ์ฟิล์มของพอลิไพโรล (ENPPy) และวิธีการกักเก็บในอิเล็กโทรพอลิเมอไรซ์ฟิล์มของพอลิไพโรลแล้วตามด้วยวิธีการเชื่อมไขว้ด้วยกลูทารัลดีไฮด์และโบวีนซีรัมอัลบูมิน (ENPPy/CL)

ไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธี ENPPy และวิธี ENPPy/CL แสดงสัญญาณตอบสนองเชิงเส้นตรงต่อแล็กโทสในช่วง 2×10^{-4} ถึง 1×10^{-3} โมลาร์ เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธี ENPPy/CL มีความไวในการตรวจวัดสูงกว่าไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธี ENPPy จากการศึกษาความคงตัวต่อการใช้งานไบโอเซนเซอร์ พบว่า หลังการใช้งานซ้ำ 20 ครั้ง ไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมด้วยวิธี ENPPy/CL สามารถรักษาสัญญาณตอบสนองได้ 76 % ของสัญญาณตอบสนองเริ่มต้น ในขณะที่สัญญาณตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมด้วยวิธี ENPPy ลดลงเหลือ 60 % ของสัญญาณตอบสนองเริ่มต้น

Abstract

A comparison between two galactose oxidase immobilization methods on platinum wire working electrode is presented in this article.

The immobilization methods employed entrapment into electropolymerized film of polypyrrole (ENPPy) and entrapment into electropolymerized film of polypyrrole followed by cross-linking with glutaraldehyde in the presence of BSA (ENPPy/CL).

Biosensors fabricated by ENPPy and ENPPy/CL methods showed similar linear response from 2×10^{-4} to 1×10^{-3} M lactose. However, biosensor prepared by ENPPy/CL method exhibited higher sensivity than that prepared by ENPPy method. Operational stability was tested. The results showed that after repeated use for 20 assays, biosensors fabricated by ENPPy/CL method can retain 76% of its original response while the current response of biosensor prepared by ENPPy method decreased to 60% of its initial response.

คำสำคัญ แล็กโทส ไบโอเซนเซอร์ การกักเก็บ การเชื่อมไขว้ พอลิไพโรล

Keywords: Lactose, Biosensor, Entrapment, Cross-linking, Polypyrrole

* นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ prinznazgul@hotmail.com

** อาจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ saipin.t@ku.ac.th

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ chockchai.t@hotmail.com

บทนำ

นมสามารถแปรรูปได้เป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด นมพร้อมดื่มเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมอย่างมาก ประเภทหนึ่งในประเทศไทย อย่างไรก็ตามผู้บริโภคบางรายต้องถูกจำกัดปริมาณการบริโภคผลิตภัณฑ์นมโดยเป็นผลมาจากอาการของโรคการแพ้แล็กโทส หรือ lactose intolerance (นฤมล และคณะ, 2547) การตรวจสอบแล็กโทสที่มีอยู่ในนมมีหลายวิธีเช่น สเปกโทรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) โพลาริเมตรี (polarimetry) อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (infared spectroscopy) ไททริเมตรี (titrimetry) และโครมาโทกราฟี (chromatography) วิธีการเหล่านี้มีความยุ่งยากและใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างนานซึ่งประกอบไปด้วยการสกัดแล็กโทสและการกรอง ไบโอเซนเซอร์คือเครื่องมือตรวจวัดสารชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนของสารชีวภาพ และส่วนของทรานส์ดิวเซอร์หรือตัวรับสัญญาณ สารชีวภาพมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวัด ตัวอย่างของสารชีวภาพ เช่น เอนไซม์ จุลินทรีย์ เนื้อเยื่อพืชและสัตว์ แอนติเจน แอนติบอดี เป็นต้น เมื่อสารชีวภาพทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวัด จะก่อให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์หรือสัญญาณที่สามารถถูกตรวจวัดได้ด้วยทรานส์ดิวเซอร์ที่เหมาะสมกับชนิดและรูปแบบของสัญญาณนั้น (โสภา, 2546) การตรึงรูปสารชีวภาพเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการเตรียมไบโอเซนเซอร์ วิธีการตรึงรูปเอนไซม์มีหลายวิธีเช่น การดูดซับ (adsorption) การกักเก็บทางกายภาพ (physical entrapment) การเชื่อมไขว้ (cross-linking) และการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนซ์ (covalent binding) เป็นต้น (Eggins,1996) ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ที่เหมาะสมในการพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแล็กโทสซึ่งอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจสอบแล็กโทสในผลิตภัณฑ์นมได้อย่างรวดเร็ว มีความถูกต้อง แม่นยำ อีกทั้งขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาวิธีการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสที่เหมาะสมในการเตรียมไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแล็กโทสโดยเปรียบเทียบวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการกักเก็บทางกายภาพกับวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการกักเก็บทางกายภาพร่วมกับวิธีการเชื่อมไขว้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การ pretreatment ขั้วไฟฟ้าใช้งานชนิดลวดแพลทินัม

เตรียมขั้วไฟฟ้าใช้งานชนิดลวดแพลทินัม โดยการตัดลวดแพลทินัมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ให้มีความยาวประมาณ 8 เซนติเมตร นำไปแช่ในสารละลายเมทานอล (methanol) ร้อนเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำขึ้นล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดแล้วแช่ในสารละลายกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่ได้จากการผสมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่ในน้ำกลั่นวางใน ultrasonic bath เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง แล้วล้างด้วย acetone อีกครั้ง เป่าให้แห้งแล้วพันด้วยเทปชนิดพอลิเททระฟลูออโรเอทิลีน โดยให้เหลือความยาวเพื่อใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ 4 เซนติเมตร (พื้นที่ในการตรึงรูปเอนไซม์ 0.628 ตารางเซนติเมตร) จากนั้นนำลวดแพลทินัมที่ผ่านการ pretreatment แล้วไปใช้ในการเตรียมเอนไซม์อิเล็กโทรดต่อไป

2. การเตรียมเอนไซม์อิเล็กโทรด

2.1 การเตรียมเอนไซม์อิเล็กโทรดโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสด้วยวิธี ENPPy เตรียมสารละลายโดยชั่งเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดส 50 มิลลิกรัม (365 ยูนิต) และโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.0268 กรัม (ความเข้มข้น 0.06 โมลาร์) ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไพโรล (pyrrole) 21

ไมโครลิตร กวนผสมเบาๆ ประมาณ 20 นาที จัดขั้วไฟฟ้าโดยใช้ลวดแพลทินัมที่ผ่านการ pretreatment เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ใช้ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงชนิดซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl/KCl(0.06 M)) และใช้ขดลวดแพลทินัมแบล็คเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย ให้กระแสคงที่ +0.100 mA/cm^2 แก่ขั้วไฟฟ้าใช้งานเป็นเวลา 50 วินาที ซึ่งคิดเป็นปริมาณไฟฟ้า 5 มิลลิคูลอมบ์ต่อตารางเซนติเมตร (5 mC/cm^2) จากนั้นนำลวดแพลทินัมที่เคลือบฟิล์มของพอลิไพโรลโดยมีเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสถูกกักเก็บอยู่ภายในไปล้างให้สะอาดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0

การเตรียมเอนไซม์อิเล็กโทรดโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสด้วยวิธี ENPPy/CL

เตรียมเอนไซม์อิเล็กโทรดดังวิธีการในข้อ 2 จากนั้นเตรียมสารละลายของเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดส โดยการชั่งเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดส 5 มิลลิกรัม (36.5 ยูนิต) และ bovine serum albumin (BSA) 0.0016 กรัม นำไปละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้น 2.5% ปริมาตร 30 ไมโครลิตรที่ได้จากการเจือจางสารละลายกลู-ทารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 25% ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 กวนผสมให้เข้ากัน แช่เอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมไว้ข้างต้นในสารละลายที่ได้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซับสารละลายออก แล้วทิ้งให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจสอบสัญญาณตอบสนองต่อไป เมื่อไม่ใช้งานเก็บเอนไซม์อิเล็กโทรดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเอนไซม์อิเล็กโทรดทั้ง 2 ชนิดไปตรวจสอบสัญญาณตอบสนองต่อแล็กโทส เมื่อไม่ใช้งานเก็บเอนไซม์อิเล็กโทรดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

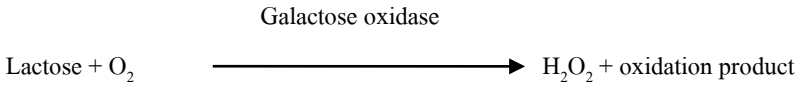
2.2 การวัดสัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรด การวัดสัญญาณตอบสนองทำในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้เอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมขึ้นเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ใช้ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์อิ่มตัว (Ag/AgCl/KCl(sat)) เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และใช้ขดลวดแพลทินัมแบล็คเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย โดยให้ความต่างศักย์คงที่ + 600 มิลลิโวลต์กับเอนไซม์อิเล็กโทรดเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl/KCl(sat) รอจนกระแสไฟฟ้าคงที่ทำให้ได้ background current จากนั้นหยดสารละลายแล็กโทสลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ กวนผสมเป็นเวลา 20 วินาที ปิดเครื่องกวนผสมแล้วรอจนสัญญาณตอบสนองคงที่อีกครั้งจึงบันทึกกระแสไฟฟ้าที่ได้ โดยสัญญาณตอบสนองต่อแล็กโทสที่ความเข้มข้นต่างๆ หาได้จากการนำกระแสไฟฟ้าที่ได้ลบด้วย background current เติมสารละลายมาตรฐานของแล็กโทสลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จนมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ ในช่วงความเข้มข้น 1×10^{-4} ถึง 8×10^{-3} โมลาร์ บันทึกสัญญาณตอบสนองแล้วนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาช่วงที่สัญญาณตอบสนองของไบโอเซนเซอร์มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงต่อความเข้มข้นของแล็กโทสและหาความไวในการตรวจวัด (sensitivity) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (เตรียมอิเล็กโทรดจำนวน 3 อิเล็กโทรด)

การศึกษาความคงตัวต่อการใช้งานของเอนไซม์อิเล็กโทรด (operational stability)

เตรียมเอนไซม์อิเล็กโทรดโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสด้วยวิธี ENPPy และวิธี ENPPy/CL ดังวิธีการในข้อ 2.1 และ 2.2 จากนั้นนำเอนไซม์อิเล็กโทรดที่ได้ไปตรวจวัดสัญญาณตอบสนองต่อแล็กโทสความเข้มข้น 6×10^{-4} โมลาร์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 ที่อุณหภูมิห้องทุกวันๆ ละ 5 ครั้ง รวม 20 ครั้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (เตรียมอิเล็กโทรดจำนวน 3 อิเล็กโทรด) เมื่อไม่มีการใช้งาน เก็บเอนไซม์อิเล็กโทรดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

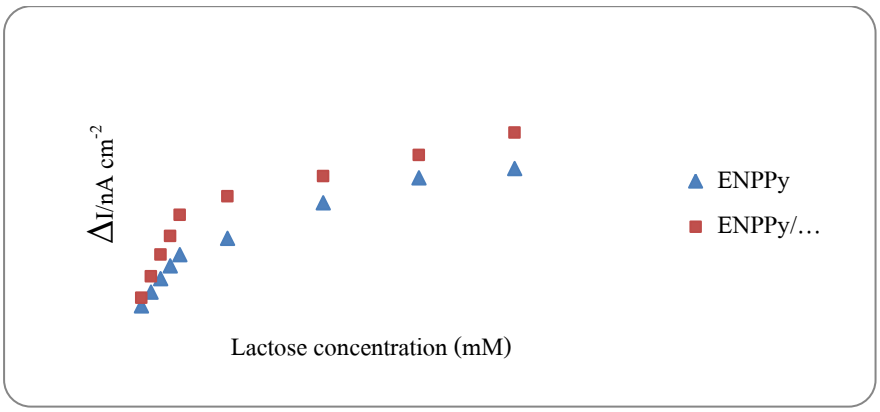
ผลการวิจัย

ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแล็กโทสที่พัฒนาขึ้นใช้เอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสเป็นสารชีวภาพ โดยเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแล็กโทสให้เป็นผลิตภัณฑ์และเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ดังภาพที่ 1 (Handan *et al*. 2002) โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นสามารถถูกออกซิไดซ์บนพื้นผิวอิเล็กโทรดเมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมคือ +600 มิลลิโวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงชนิดซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์-โพแทสเซียมคลอไรด์อิ่มตัว

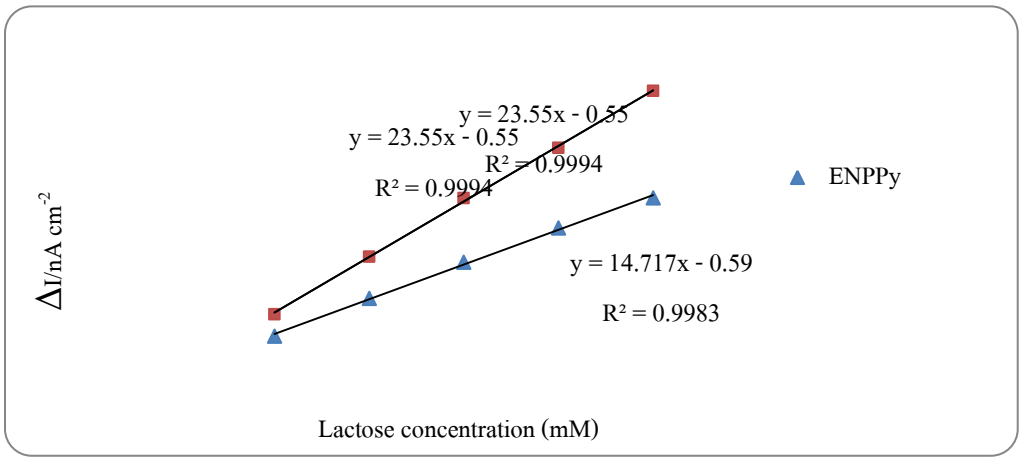


ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาการย่อยสลายแล็กโทสด้วยเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดส

สัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรด เมื่อนำเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสด้วยวิธี ENPPy และด้วยวิธี ENPPy/CL ชนิดละ3 อิเล็กโทรด ไปตรวจวัดสัญญาณตอบสนองต่อแล็กโทสในช่วงความเข้มข้น 1×10^{-4}ถึง 8×10^{-3}โมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0โดยให้ความต่างศักย์คงที่ +600 มิลลิโวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงชนิดซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์-โพแทสเซียมคลอไรด์อิ่มตัว พบว่า สัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยใช้วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ทั้ง 2 แบบ มีค่าสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแล็กโทสเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2) และสัญญาณตอบสนองที่ได้มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงต่อความเข้มข้นของแล็กโทสในช่วง 2×10^{-4}ถึง 1×10^{-3}โมลาร์ (ภาพที่ 3)โดยมีขีดจำกัดในการตรวจวัด (limit of detection) ต่อแล็กโทสที่ความเข้มข้น 2×10^{-4}โมลาร์เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม เอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธี ENPPy/CL มีความไวในการตรวจวัด (sensitivity) 23.55 นาโนแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตรต่อมิลลิโมลาร์ ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธี ENPPy ที่มีค่าความไวในการตรวจวัด 14.71 นาโนแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตรต่อมิลลิโมลาร์ เนื่องจากเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธี ENPPy/CL มีปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปสูงกว่า



ภาพที่ 2 สัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสด้วยวิธี ENPPY และวิธี ENPPy/CL

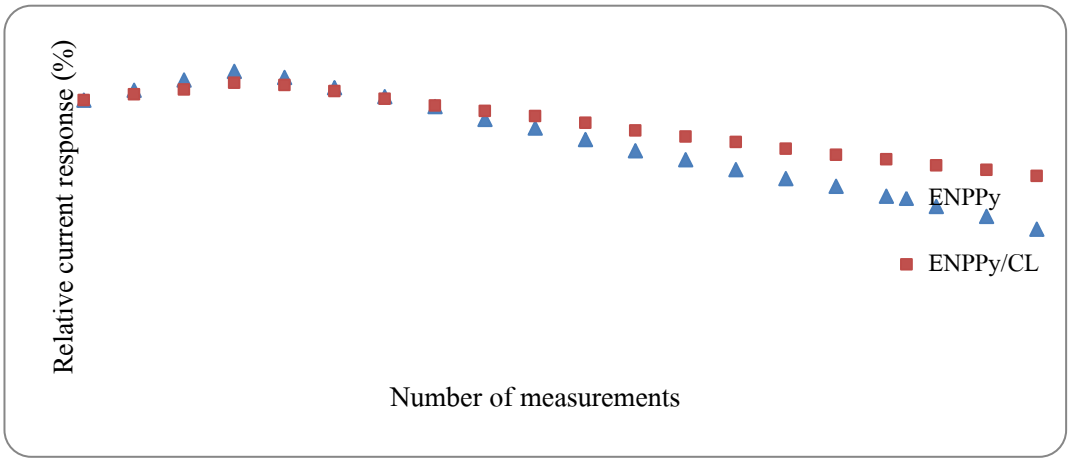


ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสด้วยวิธี ENPPY และวิธี ENPPy/CL

เอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมด้วยวิธีการตรึงรูปทั้ง 2 แบบ มีประสิทธิภาพการทำงาน (sensor performance) ใกล้เคียงกับเอนไซม์อิเล็กโทรดที่พัฒนาโดย Goktug*etal*. (2005) ซึ่งเตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและเอนไซม์เบต้ากาแล็กโทซิเดสด้วยวิธีการกักเก็บในเจลของเจลาตินแล้วเชื่อมไขว้ด้วยกลูทารัลดีไฮด์ลงบนกลาสซีคาร์บอนอิเล็กโทรดที่มีการเคลือบฟิล์มบางของปรอท และจากการตรวจวัดสัญญาณตอบสนอง พบว่าเอนไซม์อิเล็กโทรดมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงต่อแล็กโทสในช่วง 1×10^{-4}ถึง 3.5×10^{-3}โมลาร์ และมีขีดจำกัดของการตรวจวัดแล็กโทสที่ความเข้มข้น 1×10^{-4}โมลาร์

การศึกษาความคงตัวต่อการใช้งานของเอนไซม์อิเล็กโทรด จากการศึกษาความคงตัวต่อการใช้งานของเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดส ด้วยวิธี ENPPy และเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสด้วยวิธี ENPPy/CL โดยการตรวจสอบสัญญาณตอบสนองต่อแล็กโทสความเข้มข้น 6×10^{-4}โมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง ทุกวันๆ ละ 5 ครั้ง รวม 20 ครั้ง พบว่า ในช่วงแรกของการใช้งานสัญญาณตอบสนองของไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมด้วยวิธี ENPPy และวิธี ENPPy/CL มีค่าใกล้เคียงกันโดยเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากนั้นสัญญาณตอบสนองค่อยๆ ลดลง จนกระทั่งหลังการวัดครั้งที่ 10 สัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมด้วยวิธี ENPPy และวิธี ENPPy/CL เริ่มลดลงด้วยอัตราที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4)โดยสัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมวิธี ENPPy ลดลงด้วยอัตราที่เร็วกว่าสัญญาณตอบสนองของเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมด้วยวิธี ENPPy/CL โดยหลังการใช้งาน 20 ครั้ง พบว่า เอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมด้วยวิธี ENPPy/CL ยังคงแสดงสัญญาณตอบสนองสูงถึง 76 เปอร์เซ็นต์ โดยสัญญาณตอบสนองลดลงเหลือ 11.4 นาโนแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตรต่อมิลลิโมลาร์ จากสัญญาณตอบสนองเริ่มต้น 14.7 นาโนแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตรต่อมิลลิโมลาร์ ในขณะที่เอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมด้วยวิธี ENPPy แสดงสัญญาณตอบสนองลดลงเหลือเพียง 60 เปอร์เซ็นต์ โดยสัญญาณตอบสนองลดลงเหลือ 5.2 นาโนแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตรต่อมิลลิโมลาร์ จากสัญญาณตอบสนองเริ่มต้น 8.2 นาโนแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตรต่อมิลลิโมลาร์ โดยทั้งนี้อาจเกิดจากเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมด้วยวิธี ENPPy/CL มีปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปสูงกว่า และยังอาจเกิดจากผลของวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ โดยการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยการเชื่อมไขว้จะใช้สารไบฟังก์ชันนอลหรือมัลติฟังก์ชันนอล (bi-or multifunctional agent) ทำให้เกิดการเชื่อมระหว่างเอนไซม์กับ

เอนไซม์ หรือเอนไซม์กับโปรตีนที่เติมลงไป เช่น BSA (Canh, T.M., 1993) เอนไซม์จึงหลุดออกจากพื้นผิวอิเล็กโทรดได้ยาก ดังนั้นเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมด้วยวิธี ENPPy/CL จึงมีความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมด้วยวิธี ENPPy



ภาพที่ 4 ความคงตัวต่อการใช้งานของเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสด้วยวิธีENPPy และวิธี ENPPy/CL

อภิปรายผลการวิจัย

ไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสด้วยวิธี ENPPy/CL มีความไวในการตรวจวัดเท่ากับ 23.55 นาโนแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตรต่อมิลลิโมลาร์ ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสด้วยวิธี ENPPy ที่มีค่าความไวในการตรวจวัดเท่ากับ 14.71 นาโนแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตรต่อมิลลิโมลาร์

ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้โดยใช้วิธีการตรึงรูปทั้ง 2 แบบ มีประสิทธิภาพการทำงานใกล้เคียงกับเอนไซม์อิเล็กโทรดที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ (Goktug *et al*., 2005)

จากการศึกษาความคงตัวต่อการใช้งานของเอนไซม์อิเล็กโทรด พบว่า หลังการใช้งาน 20 ครั้ง ไบโอเซนเซอร์ที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์กาแล็กโทสออกซิเดสด้วยวิธี ENPPy/CL ยังคงรักษาสัญญาณตอบสนองได้สูงถึง 76 เปอร์เซ็นต์ของสัญญาณตอบสนองเริ่มต้น ในขณะที่เอนไซม์อิเล็กโทรดที่เตรียมโดยการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธี ENPPy แสดงสัญญาณตอบสนองลดลงเหลือเพียง 60 เปอร์เซ็นต์ของสัญญาณตอบสนองเริ่มต้น

ข้อเสนอแนะ

ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแล็กโทสที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ควรมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมและการใช้งานของไบโอเซนเซอร์ต่อไป ซึ่งจะทำให้ได้ไบโอเซนเซอร์ที่มีประสิทธิภาพการทำงานดีขึ้น

เอกสารอ้างอิง

นฤมล เด่นทรัพย์สุนท และคณะ (2547) "การศึกษาภาวการณ์ไม่ทนต่อน้ำตาลแลคโตสในผู้ใหญ่ไทย" JOURNAL OF MEDICAL ASSOCIATION OF THAILAND. 87: 1501-1505.

โสภา กลิ่นจันทร์. (2546) ไบโอเซนเซอร์เบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร. ศูนย์ผลิตตำราเรียน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

Canh, M. T. (1993) Biosensors. Paris. Chapman & Hall and Masson.

Eggins, B.R. (1996) Biosensors: An Introduction. New York. Wiley & Sons and B.G. Teubner Publisher.

Goktug, T., M. K. Sezginturk and E.Dinchaya. (2005) "Glucose oxidase-β-galactosidase hybrid biosensor based on glassy carbon electrode modified with mercury for lactose determination." ANALYTICA CHIMICA ACTA. 551: 51-56.

Handan, G., A. Gulce, and A.Yildiz. (2002) "A novel two-enzyme amperometric electrode for lactose determination." ANALYTICAL SCIENCE. 18 : 147-150.

Palmer, T. (1991) Understanding Enzymes. 3rd ed. London. Ellis Horwood Publisher.