บทที่ 5

การตรึงเอนไซม์ลงบนทรานส์ดิวเซอร์

บทนำ

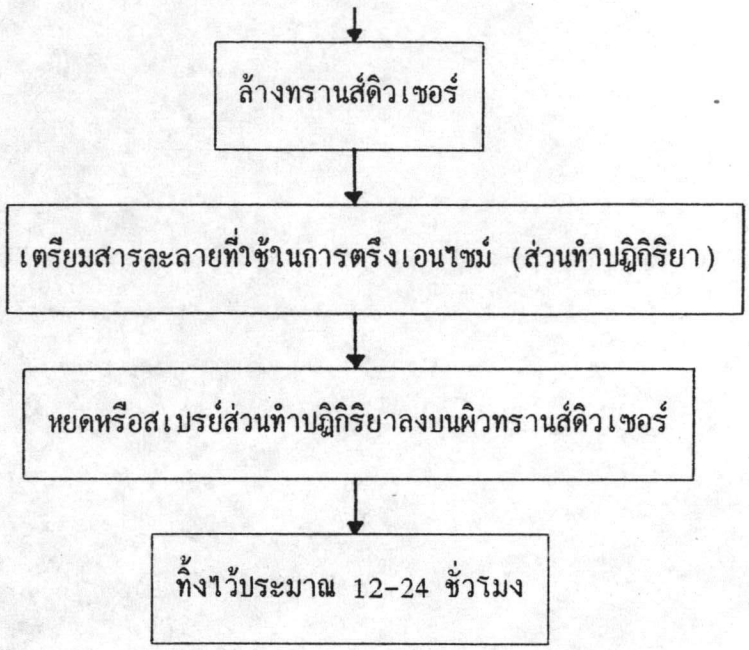
ในงานวิจัยนี้ ได้ทดลองตรึงเอนไซม์ลงบนทรานส์ดิวเซอร์วิธีต่างๆ กัน 4 วิธี วิธีเหล่านั้นได้แก่

1. การตรึงเอนไซม์แบบฝัง (entrapment) ในโครงร่างแหของอีพือกซี
2. การตรึงเอนไซม์แบบการสร้างพันธะเคมี โดยใช้ไซเลน (silane) และกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)
3. การตรึงเอนไซม์แบบการสร้างพันธะเคมี โดยใช้ไซเลน (silane) และพี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ (p-nitrobenzoylchloride)
4. การตรึงเอนไซม์ โดยวิธีอิเล็กโตรโพลีเมอร์ไรเซชั่นของสารโพลีไพโรล(poly pyrrole)

ในบทนี้ จะกล่าวถึงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แต่ละชนิดลงบนทรานส์ดิวเซอร์ และผลของตัวแปรสำคัญ ที่มีต่อลักษณะสมบัติของเซนเซอร์ที่ทำขึ้น

5.1 การตรึงเอนไซม์แบบฝัง (entrapment) ในโครงร่างแหของอีพือกซี

ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แสดงได้ดังรูป 5.1



รูปที่ 5.1 ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แบบผังในโครงร่างแหอีพือกซี

ส่วนทำปฏิกิริยาที่ทำขึ้น มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

1. เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส
2. สารส่งผ่านอิเล็กตรอน ซึ่งในที่นี้ใช้สารเฟอร์โรซีน
3. อีพือกซี
4. เอทธิลแอลกอฮอล์
5. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.01 M) pH 7.2

สารอีพือกซีที่ใช้ จะประกอบด้วยสาร 2 ชนิด ซึ่งเมื่อนำมาผสมกัน แล้วละลายในเอทธิลแอลกอฮอล์ สารทั้ง 2 จะเริ่มทำปฏิกิริยากัน เกิดเป็นสารโพลิเมอร์ ที่มีโครงสร้างเป็นร่างแห

การเตรียมส่วนทำปฏิกิริยามีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์
2. ทำการละลายเฟอร์โรซีน และอีพือกซีในเอทธิลแอลกอฮอล์
3. ผสมสารละลายในข้อ 1 และข้อ 2 เข้าด้วยกัน

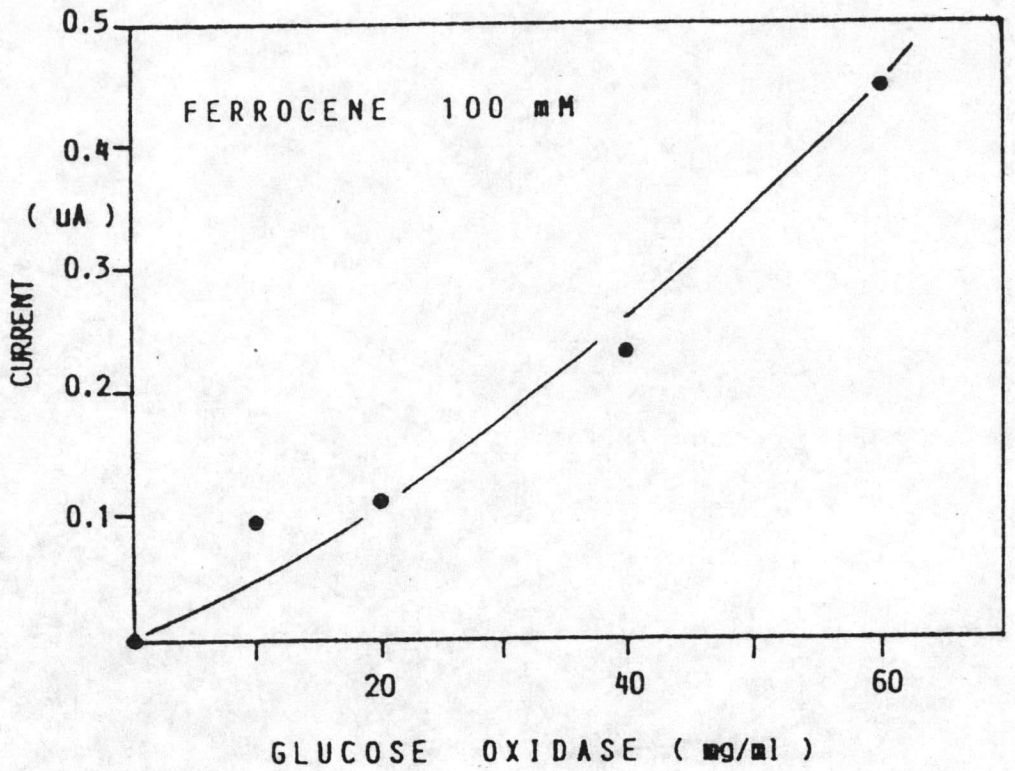
ผลของตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อคุณสมบัติของเซนเซอร์ที่ทำขึ้น ได้แก่ ปริมาณของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสที่ใช้ และปริมาณของเฟอร์โรซีน ผลของตัวแปรทั้ง 2 ได้มีการศึกษาอย่างละเอียดโดย มานะ ศรียุทธศักดิ์ (2534) ซึ่งในที่นี้ จะขอกล่าวถึงวิธีการศึกษา และผลของตัวแปรทั้ง 2 โดยสรุป

ในการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และเฟอร์โรซีนที่ใช้ ต่อปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ได้จากเซนเซอร์ ทำโดยการวัดผลตอบสนองแบบแบตช์ (batch)

5.1.1 ผลของปริมาณเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (มานะ ศรียุทธศักดิ์ , 2534)

ในการศึกษา ผลของปริมาณเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ต่อกระแสไฟฟ้าที่ได้จาก เซนเซอร์ ได้มีการเปลี่ยนความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในส่วนทำปฏิกิริยา จาก 0 ถึง 60 mg/ml โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเฟอร์โรซีนมีค่าคงที่ เท่ากับ 100 mM

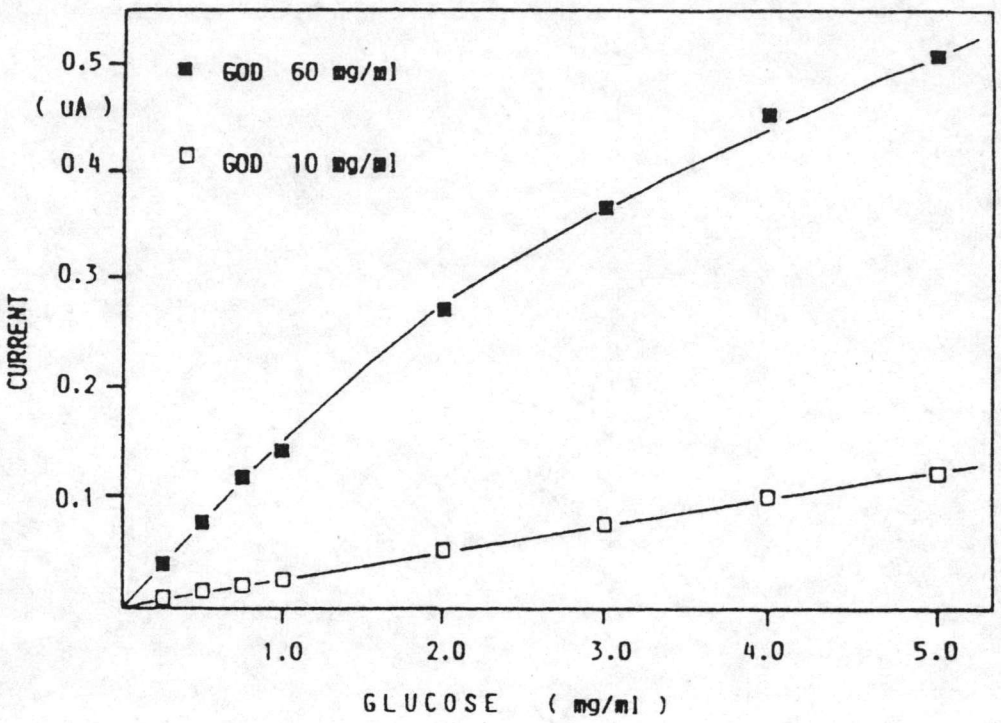
ในการหาผลตอบสนองได้ทำโดยฉีดสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml โดยทำการบันทึกผลตอบสนองที่เวลา 1 นาทีหลังการฉีด รูปที่ 5.1แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้าที่บันทึกได้ กับความเข้นข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึง



รูปที่ 5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้า กับความเข้มข้นของเอนไซม์

จากรูปที่ 5.2 จะเห็นได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์มีค่ามากขึ้น กระแสไฟฟ้าที่บันทึกได้ก็จะมีค่าสูงขึ้นด้วย ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าเมื่อปริมาณของเอนไซม์มากขึ้น เอนไซม์ที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำตาลกลูโคส ก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ในการประดิษฐ์เซนเซอร์ถ้าหากต้องการเซนเซอร์ที่มีความไว (sensitivity) สูง ก็ควรทำการตรึงส่วนทำปฏิกิริยาที่มีปริมาณเอนไซม์มากๆ

ในการศึกษาผลตอบสนองของหัววัดน้ำตาลที่ทำขึ้น ต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส ได้มีการเปรียบเทียบผลตอบสนองของเซนเซอร์ที่ทำการตรึงเอนไซม์ไว้มาก (60mg/ml) กับเซนเซอร์ที่ตรึงเอนไซม์ไว้น้อย (10 mg/ml) โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 1-5 mg/ml ผลตอบสนองแสดงไว้ในรูปที่ 5.3



รูปที่ 5.3 ผลตอบสนองของเซนเซอร์ที่ตรึงเอนไซม์ไว้มาก (60 mg/ml) และเซนเซอร์ที่ทำการตรึงเอนไซม์ไว้น้อย (10 mg/ml)

จากรูปที่ 5.3 จะเห็นได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมีค่าเพิ่มขึ้นกระแสไฟฟ้าที่บันทึกได้ก็จะมีค่าสูงขึ้นด้วย และเซนเซอร์ที่มีการตรึงเอนไซม์ไว้มาก กระแสไฟฟ้าที่วัดได้จะมีค่าสูงกว่าเซนเซอร์ที่ทำการตรึงเอนไซม์ไว้น้อย

จากรูปที่ 5.3 ความไวในการวัดน้ำตาลกลูโคส และความเป็นเส้นตรงในการวัดของเซนเซอร์ที่ทำการตรึงเอนไซม์ไว้ 60 mg/ml เป็นดังสมการที่ (5.1) และ (5.2)

ความไว $y = 37.16 + 100.79*x$ (5.1)

ความเป็นเส้นตรง $r = 0.9829$ (5.2)

โดยที่ x คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (mg/dl)

y คือ ค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ (uA)

r คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง (correlation coefficient)

ส่วนความไวในการวัดน้ำตาลกลูโคส และความเป็นเส้นตรงในการวัดของเซนเซอร์ที่ทำการตรึงเอนไซม์ไว้ 10 mg/ml เป็นดังสมการที่ (5.3) และ (5.4)

ความไว $y = 0.21 + 24.32*x$ (5.3)

ความเป็นเส้นตรง $r = 0.999$ (5.4)

โดยที่ x คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (mg/dl)
y คือ ค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ (uA)
r คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง (correlation coefficient)

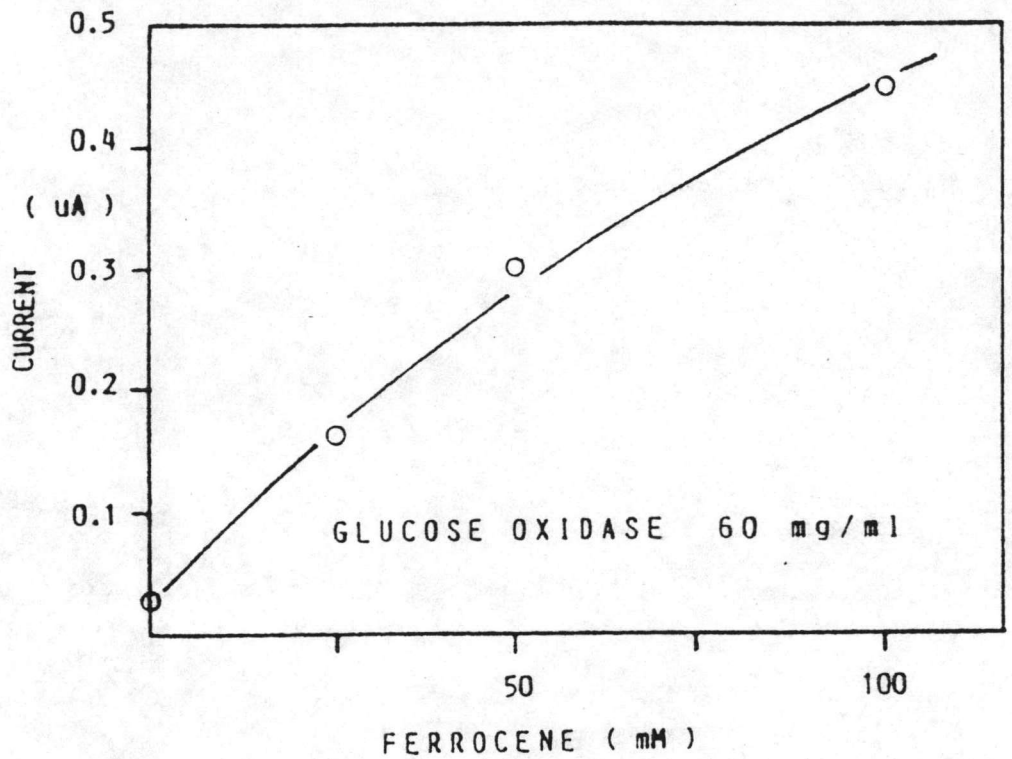
จะเห็นได้ว่า เซนเซอร์ที่ทำการตรึงเอนไซม์ด้วยความเข้มข้น 60 mg/ml จะมีความไวในการวัดมากกว่าเซนเซอร์ที่ตรึงด้วยความเข้มข้น 10 mg/ml เกือบ 4 เท่า แต่เมื่อพิจารณาช่วงของการวัด (dynamic range) แล้ว พบว่าเซนเซอร์ที่มีการตรึงเอนไซม์ไว้ต่ำจะมีผลตอบสนองเป็นเส้นตรงต่อน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นถึง 5 mg/ml โดยมีค่าความเป็นเส้นตรงเป็น 0.999 ในขณะที่เซนเซอร์ที่มีการตรึงเอนไซม์ไว้มาก จะมีผลตอบสนองเป็นเส้นตรงต่อน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นเพียง 1 mg/ml เท่านั้น (ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.9996 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงกว่านี้ ผลตอบสนองที่ได้ต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะมีลักษณะเป็นเส้นโค้งโดยมีค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.9829)

ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า เซนเซอร์ที่มีการตรึงเอนไซม์ไว้น้อย จะมีช่วงกว้างในการวัด (dynamic range) กว้างกว่าเซนเซอร์ที่มีการตรึงเอนไซม์ไว้มาก โดยมีความไวในการวัดที่ต่ำกว่า ในการวัดสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสน้อย จึงควรทำการตรึงเอนไซม์ไว้มากๆ ราว 60 mg/ml ส่วนในกรณีที่ต้องการวัดสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสมาก ก็ควรทำการตรึงเอนไซม์ไว้น้อยๆ โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ราว 10 mg/ml

5.1.2 ผลของสารส่งผ่านอิเล็กตรอน (ferrocene)(มานะ ศรียุทธศักดิ์ , 2534)

ในการศึกษาผลของสารส่งผ่านอิเล็กตรอน ต่อปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ได้จากเซนเซอร์ ได้มีการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารส่งผ่านอิเล็กตรอนที่ใช้ในการตรึงจาก 0 ถึง 100 mM โดยกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ให้มีค่าคงที่เท่ากับ 60 mg/ml

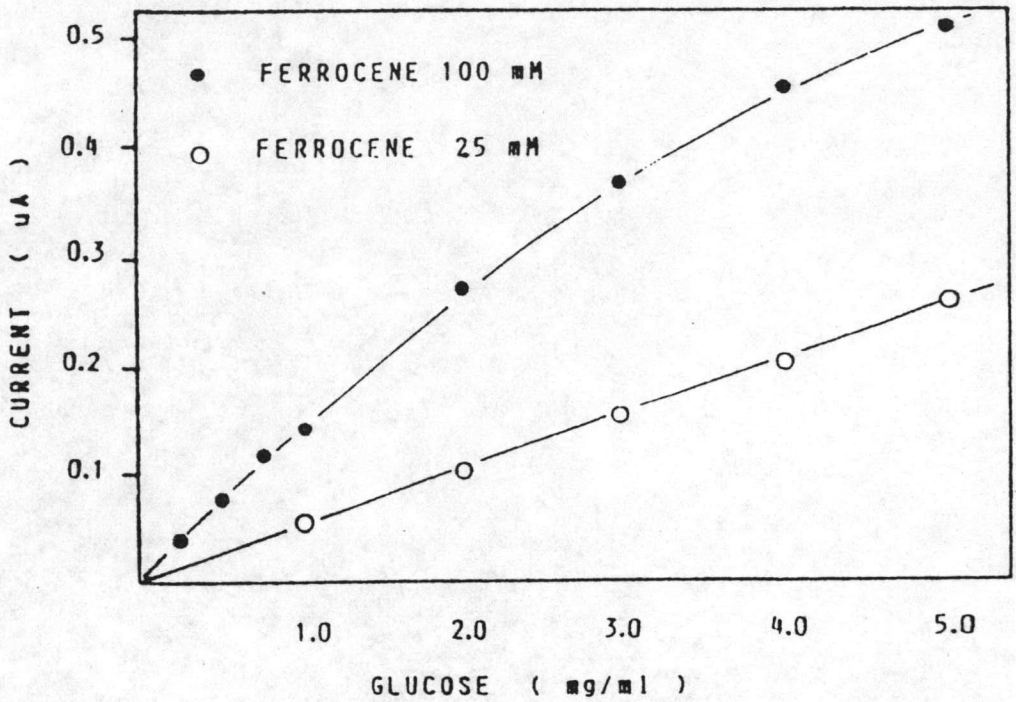
ในการหาผลตอบสนอง ได้ทำการฉีดสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml โดยทำการบันทึกผลตอบสนองที่เวลา 1 นาทีหลังการฉีด รูปที่ 5.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้าที่บันทึกได้กับความเข้มข้นของเฟอร์โรซีนที่ใช้ในการตรึง



รูปที่ 5.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเฟอร์โรซีนกับกระแสไฟฟ้า

จะเห็นได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของเฟอร์โรซีนที่ใช้ในการตรึงมีค่าสูงขึ้น กระแสไฟฟ้าที่วัดได้ก็มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากเฟอร์โรซีนมีหน้าที่ในการส่งผ่านอิเล็กตรอน เมื่อมีปริมาณมากขึ้นการส่งผ่านอิเล็กตรอนก็ทำได้ดีขึ้น จึงเป็นผลให้ค่ากระแสที่วัดได้มีค่ามากขึ้นด้วย

ในการศึกษาผลตอบสนองของหัววัดน้ำตาลที่ทำขึ้น ต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ได้มีการเปรียบเทียบผลตอบสนองของเซนเซอร์ที่ทำการตรึงเฟอร์โรซีนไว้ 25 mM และ 100 mM โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 1-5 mg/ml ผลตอบสนองแสดงไว้ในรูปที่ 5.5



รูปที่ 5.5 ผลตอบสนองของเซนเซอร์ที่ทำการตรึงเฟอร์โรซีน 25 mM และ100 mM

จะเห็นได้ว่า ผลของความเข้มข้นของเฟอร์โรซีนมีลักษณะเดียวกับผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ คือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเฟอร์โรซีนในการตรึงค่าต่ำๆ จะเป็นผลให้สัญญาณกระแสไฟฟ้าที่ได้มีค่าต่ำ แต่มีช่วงการวัดที่กว้าง และเมื่อใช้ความเข้มข้นเฟอร์โรซีนสูงจะทำให้เซนเซอร์มีผลตอบสนองสูง แต่มีช่วงการวัดที่แคบ

จากรูปที่ 5.5 ความไวในการวัดน้ำตาลกลูโคส และความเป็นเส้นตรงในการวัดของเซนเซอร์ที่ทำการตรึงเฟอร์โรซีนไว้ 25 mM เป็นดังสมการที่ (5.5) และ (5.6)

ความไว $y = -1.25 + 51.75*x$ (5.5)

ความเป็นเส้นตรง $r = 0.999$ (5.6)

โดยที่ x คือ ความเข้มข้นของเฟอร์โรซีน (mM)

y คือ ค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ (uA)

r คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง

ส่วนความไวในการวัดน้ำตาลกลูโคส และความเป็นเส้นตรงในการวัดของเซนเซอร์ที่ทำการตรึงเฟอร์โรซีนไว้ 100 mM เป็นดังสมการที่ (5.7) และ (5.8)

ความไว $y = 37.16 + 100.79*x$ (5.7)

ความเป็นเส้นตรง $r = 0.9829$ (5.8)

โดยที่ x คือ ความเข้มข้นของเฟอร์โรซีน (mM)

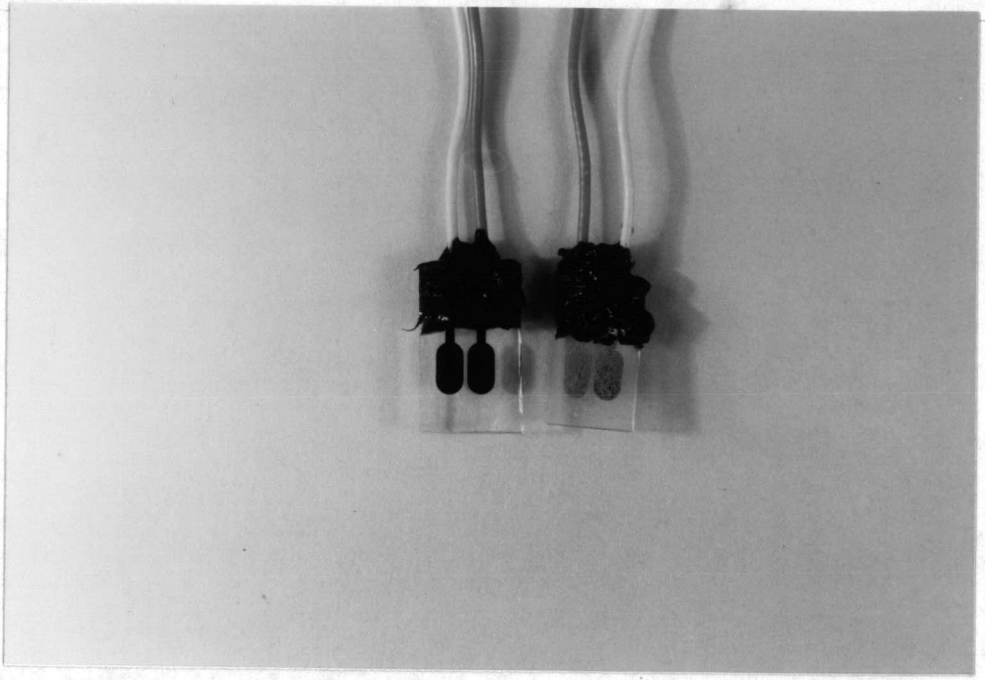
y คือ ค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ (uA)

r คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง

ในการนำเซนเซอร์ไปใช้วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในสารตัวอย่างจริง เนื่องจากในสารตัวอย่าง โดยทั่วไปจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสไม่สูงมากนัก ดังนั้นเพื่อที่จะได้ผลตอบสนองที่มีค่าสูง จึงทำการตรึงเอนไซม์ที่มีส่วนผสมของส่วนทำปฏิกิริยาดังนี้

1.	เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	50	mg
2.	สารส่งผ่านอิเล็กตรอน ซึ่งในที่นี้ใช้สารเฟอร์โรซีน	18.6	mg
3.	อีพือกซี	50	mg
4.	เอทธิลแอลกอฮอล์	0.5	ml
5.	สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01M	0.5	ml

รูปที่ 5.6 แสดงลักษณะผิวของอิเล็กโทรดก่อน และหลังการตรึงเอนไซม์



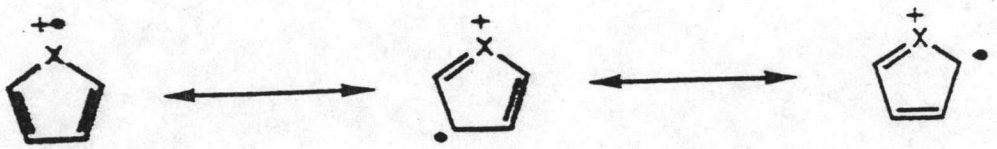
รูปที่ 5.6 ลักษณะผิวของอิเล็กโทรดก่อน และหลังการตรึงเอนไซม์

5.2 การตรึงเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชั่นของสารโพลีไพโรล (polypyrrole)

การเกิดโครงสร้างโพลิเมอร์ของสารโพลีไพโรล สามารถทำได้โดยใช้ไฟฟ้ากระตุ้น ซึ่งสามารถอธิบายการเกิดได้ดังนี้ (Terje , 1986)

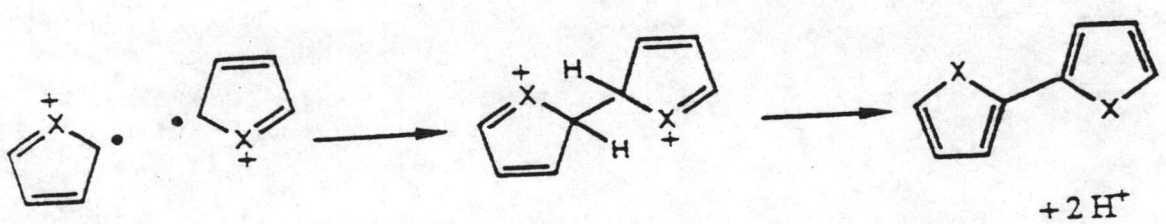
สารโพลีไพโรล โดยปกติจะมีโครงสร้างเป็นแบบโมโนเมอร์ ซึ่งเมื่อถูกศักย์ไฟฟ้ากระตุ้น จะทำให้สารโพลีไพโรลอยู่ในสภาวะถูกออกซิไดซ์ ซึ่งโครงสร้างที่เกิดขึ้น จะไม่มีความเสถียรภาพ โครงสร้างที่เกิดขึ้น จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอยู่ 2 แบบ (resonance form) โครงสร้างที่เกิดขึ้นทั้ง 2 แบบ แสดงในรูปที่ 5.7

โมโนเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบเรโซแนนซ์ อาจเกิดการจับตัวกัน โดยการสร้างพันธะเกิดเป็นโพลีเมอร์ ดังแสดงในรูปที่ 5.8 ซึ่งการสร้างพันธะกันระหว่างโมโนเมอร์อาจเกิดต่อเนื่องกันไป จนเกิดโพลีเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็นลูกโซ่ที่มีประจุลบได้



โครงสร้างที่ 1 โครงสร้างที่ 2 โครงสร้างที่ 3

รูปที่ 5.7 โครงสร้างแบบเรโซแนนซ์ของสารโพลีไพโรล เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไฟฟ้า



โครงสร้างแบบเรโซแนนซ์ การเกิดพันธะกันระหว่างโมโนเมอร์ โพลีเมอร์ที่เกิดขึ้น

รูปที่ 5.8 การเกิดพันธะกันระหว่างโมโนเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบเรโซแนนซ์ เกิดเป็นโพลีเมอร์

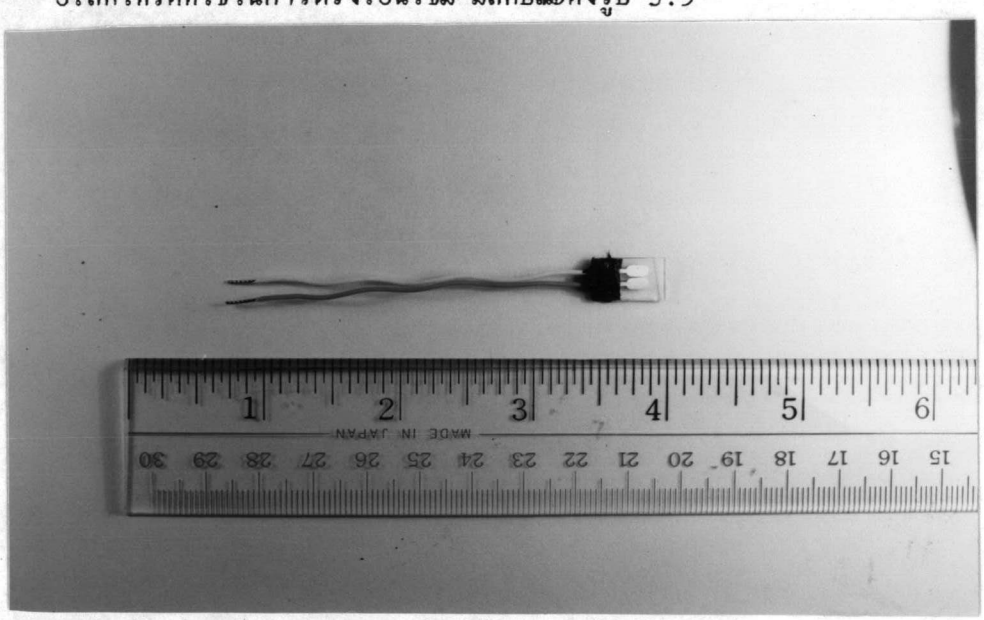
ดังนั้นจะเห็นได้ว่า เมื่อทำการป้อนศักย์ไฟฟ้าแก่สารโพลีไพโรล จะเกิดโพลิเมอร์ขึ้นที่บริเวณผิวหน้าของอิเล็กโทรดขั้วบวก ถ้าหากได้มีการผสมเอนไซม์ ลงไปในสารละลายโพลีไพโรลด้วยแล้ว ในระหว่างที่มีการเกิดโพลีเมอร์ขึ้น จะมีเอนไซม์บางส่วนถูกฝังเข้าไปในโครงสร้างของโพลีเมอร์ที่เกิดขึ้นด้วย โดยเอนไซม์จะยังคงมีแอกติวิตี้ในการทำปฏิกิริยาอยู่เช่นเดิม

ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้เป็นส่วนทำปฏิกิริยามีดังนี้

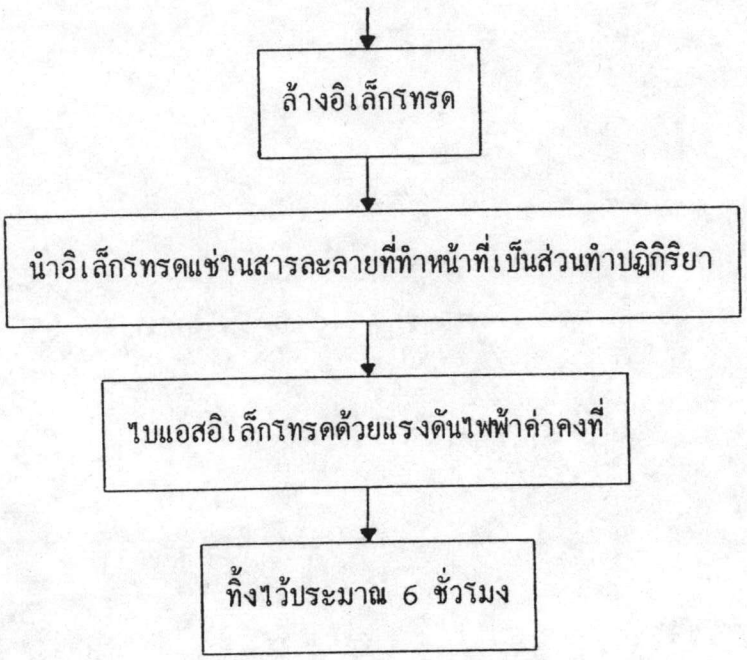
1. สารโพลีไพโรล (polypyrrole)
2. เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส
3. สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)
4. สารส่งผ่านอิเล็กตรอน(เฟอร์โรซีน)
5. เอทธิลแอลกอฮอร์

ในขณะที่สารโพลีไพโรล (polypyrrole) มีการจับตัวกัน เกิดเป็นโครงสร้างโพลีเมอร์เกาะติดที่ขั้วแอโนดของอิเล็กโทรด จะมีเอนไซม์ และเฟอร์โรซีนบางส่วนถูกฝังเข้าไปในโครงร่างแหของโพลิเมอร์ที่เกิดขึ้นด้วย จึงทำให้สามารถใช้เอนไซม์ในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้

อิเล็กโทรดที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ มีลักษณะดังรูป 5.9



รูปที่ 5.9 อิเล็กโทรดที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์



รูปที่ 5.10 ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโพลิเมอร์ไรเซชั่น

ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แสดงได้ดังรูปที่ 5.10

ในขั้นแรก จะทำการศึกษาการเกิดโพลิเมอร์ของสารโพลีไพโรล (polypyrrole) โดยทำการตรึงเอนไซม์ที่มีส่วนผสมของส่วนทำปฏิกิริยาดังนี้

1. สารโพลีไพโรล (polypyrrole)
2. เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส
3. สารละลายโพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.1M

ขั้นตอนการเตรียมส่วนทำปฏิกิริยามีดังนี้

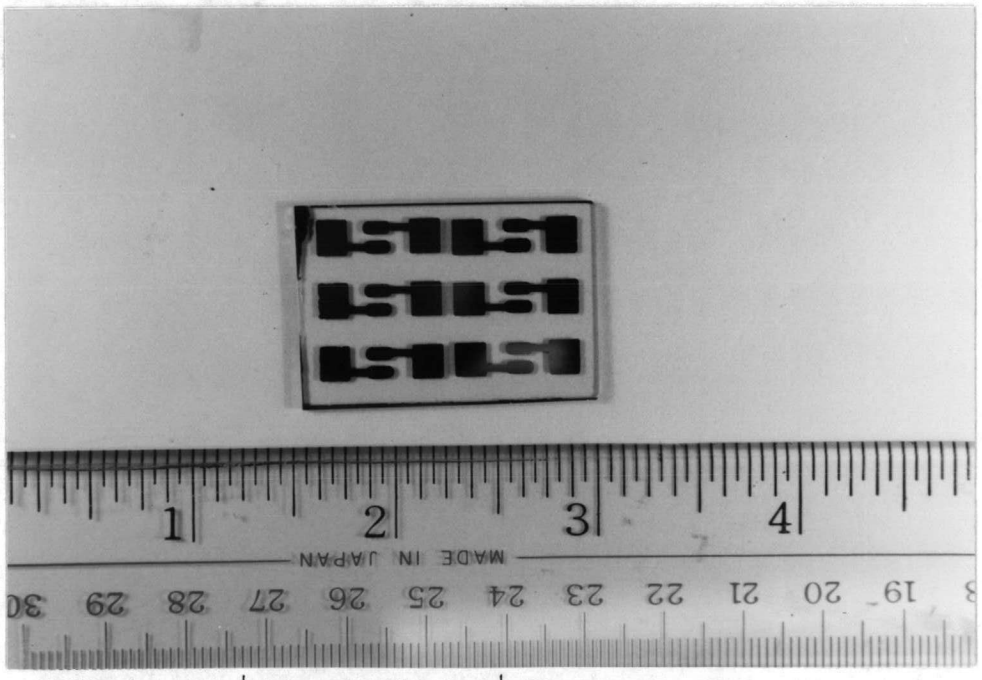
1. เตรียมสารละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 15 mg/ml
2. นำสารละลายโพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.1M 4 ml ไปทำการไล่แก๊ซออกซิเจน (bubling) ด้วยแก๊ซไนโตรเจนให้หมดไป โดยเวลาที่ใช้ในการไล่แก๊ซออกซิเจนมีค่าประมาณ 10 นาที

3. นำสารโพลีไพโรล (polypyrrole) 20 ul ผสมกับสารละลายในข้อ 2
4. นำสารละลายในข้อ 3 1 ml ผสมกับสารละลายในข้อ 1

จากผลการทดลองพบว่า ลักษณะของฟิลม์ที่เกิดขึ้น ยังมีการเกิดที่ไม่แน่นอน คือ ที่อิเล็กโทรดบางตัวเท่านั้นมีการเกิดฟิลม์ขึ้น และลักษณะของฟิลม์ที่เกิดขึ้น ก็มีการเกิดที่ไม่สม่ำเสมออีกด้วย โดยฟิลม์เกิดไม่เต็มพื้นที่ของขั้วแอโนด

ในการแก้ปัญหา อันเนื่องมาจากฟิลม์เกิดขึ้นบนอิเล็กโทรดบางตัวเท่านั้น จึงได้ทำการทดสอบลักษณะสมบัติของอิเล็กโทรดที่ทำขึ้นแต่ละตัวว่ามีคุณสมบัติแตกต่างกันมากน้อยเพียงไร การทดสอบได้ทำโดย การวัดค่าความเก็บประจุของอิเล็กโทรด ขณะแช่อยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เพื่อดูความแตกต่างของคุณสมบัติทางไฟฟ้าของอิเล็กโทรด ผลปรากฏว่าค่าความเก็บประจุที่วัดได้มีค่าแตกต่างกันมาก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลงสูงถึง 14.01 % ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากอิเล็กโทรดที่ทำขึ้นได้ผ่านกระบวนการหลายขั้นตอนในการประดิษฐ์ เช่น จะต้องทำการบัดกรี และจะต้องทำการหุ้มด้วยกาวซิลิโคนด้วย ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ล้วนมีผลต่อค่าความเก็บประจุของอิเล็กโทรดเอง จึงเป็นผลให้คุณสมบัติของอิเล็กโตรดแต่ละตัวแตกต่างกันมาก

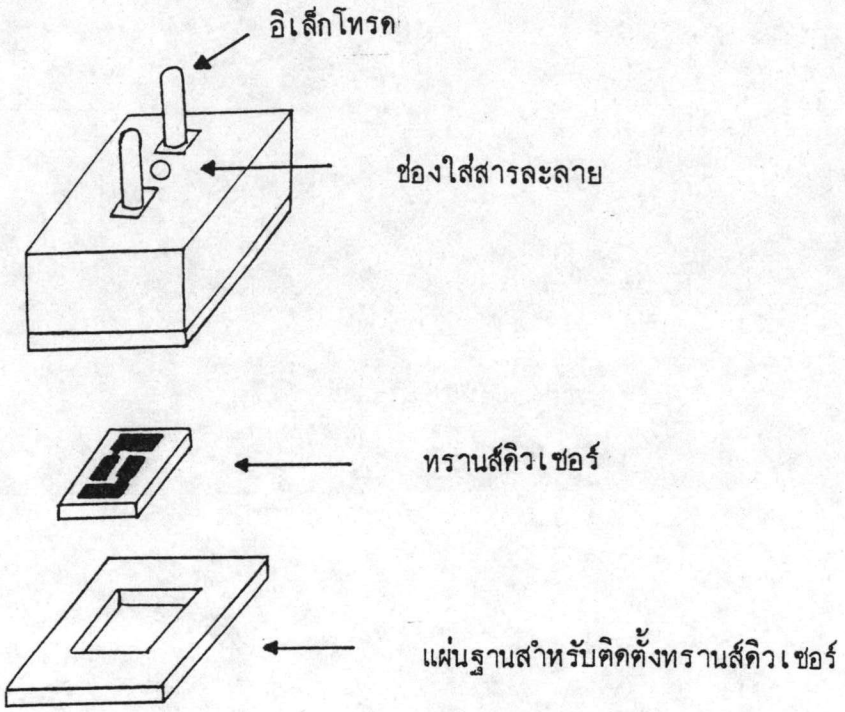
เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว จึงได้ปรับปรุงรูปร่างของอิเล็กโทรดที่ทำขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5.11



รูปที่ 5.11 อิเล็กโทรดที่ปรับปรุงรูปร่างใหม่

ซึ่งในการตรึงเอนไซม์โดยใช้อิเล็กโทรดรูปร่างใหม่นี้ จะต้องทำการประดิษฐ์อุปกรณ์ที่ใช้ในการติดตั้งอิเล็กโทรดด้วย

รูปที่ 5.12 แสดงโครงสร้างของอุปกรณ์ที่ใช้ในการติดตั้งอิเล็กโทรด และรูปที่ 5.13 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการติดตั้งอิเล็กโทรด

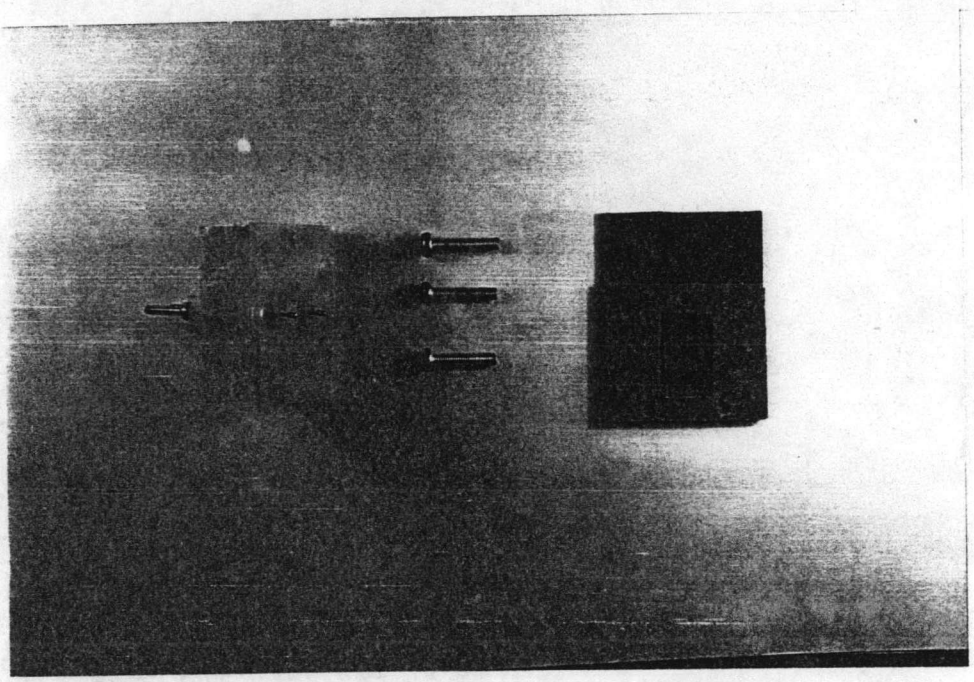


รูปที่ 5.12 โครงสร้างของอุปกรณ์ที่ใช้ในการติดตั้งอิเล็กโทรด

ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ที่ใช้ยังคงเหมือนเดิม เพียงแต่จะต้องมีการฉีดสารละลายที่เตรียมไว้ (ส่วนทำปฏิกิริยา) เข้าไปในช่องใส่สารละลายแทน

ลักษณะของฟิลม์ที่เกิดขึ้น หลังการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอิเล็กโทรด พบว่ามีฟิลม์เกิดขึ้นที่ขั้วแอโนดของอิเล็กโตรดทุกตัว แต่ฟิลม์ที่เกิดขึ้นยังมีการเกิดที่ไม่สม่ำเสมอ คือฟิลม์เกิดขึ้นไม่เต็มพื้นที่ของขั้วแอโนด สาเหตุที่ทำให้ฟิลม์เกิดขึ้นไม่สม่ำเสมอ อาจมีสาเหตุเนื่องจากการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากขั้วคาโทดไปยังขั้วแอโนดไม่ดีพอ ดังนั้นจึงได้ทำการปรับปรุงให้พื้นที่ของขั้วคาโทดมีขนาดใหญ่กว่าของขั้วแอโนดขณะทำการตรึงเอนไซม์ เพื่อให้การถ่ายเทอิเล็กตรอนสามารถทำได้เต็มที่ ในที่นี้ได้ให้พื้นที่ของขั้วคาโทดมีขนาดใหญ่กว่าของแอโนด 30 % การกำหนดพื้นที่ของ

ขั้วอิเล็กโทรด ทำได้โดยกำหนดส่วนของอิเล็กโทรดที่สัมผัสกับสารละลาย ซึ่งสามารถกำหนดจากตำแหน่งของแผ่นซิลิโคนที่ใช้ในการป้องกันไม่ให้สารละลายรั่วไหลออกจากเซลล์ไหลผ่าน

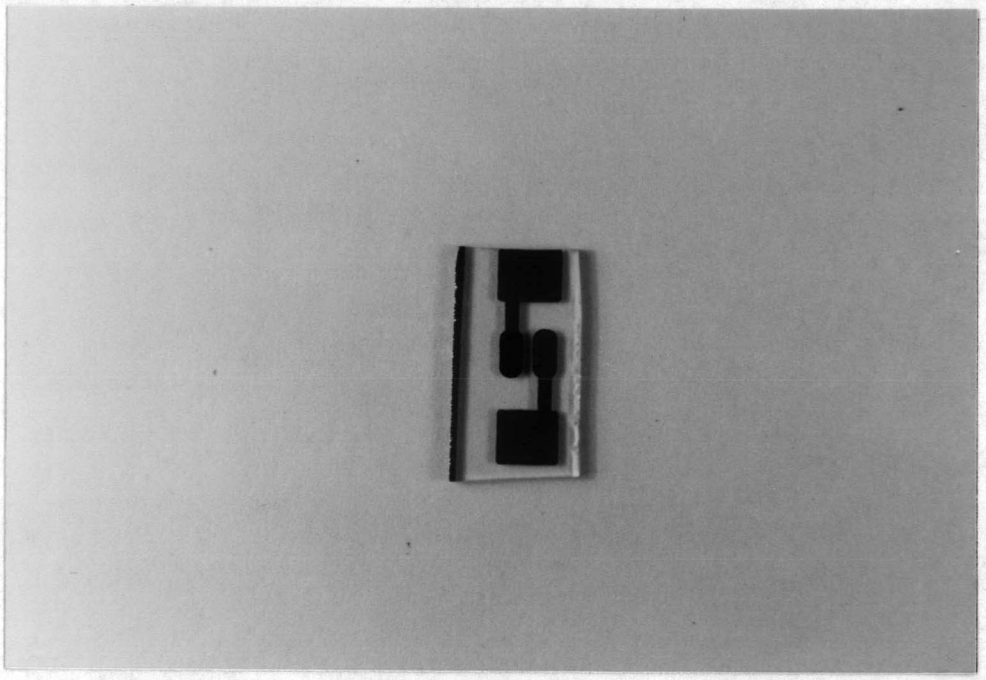


รูปที่ 5.13 อุปกรณ์ที่ใช้ในการติดตั้งอิเล็กโทรด

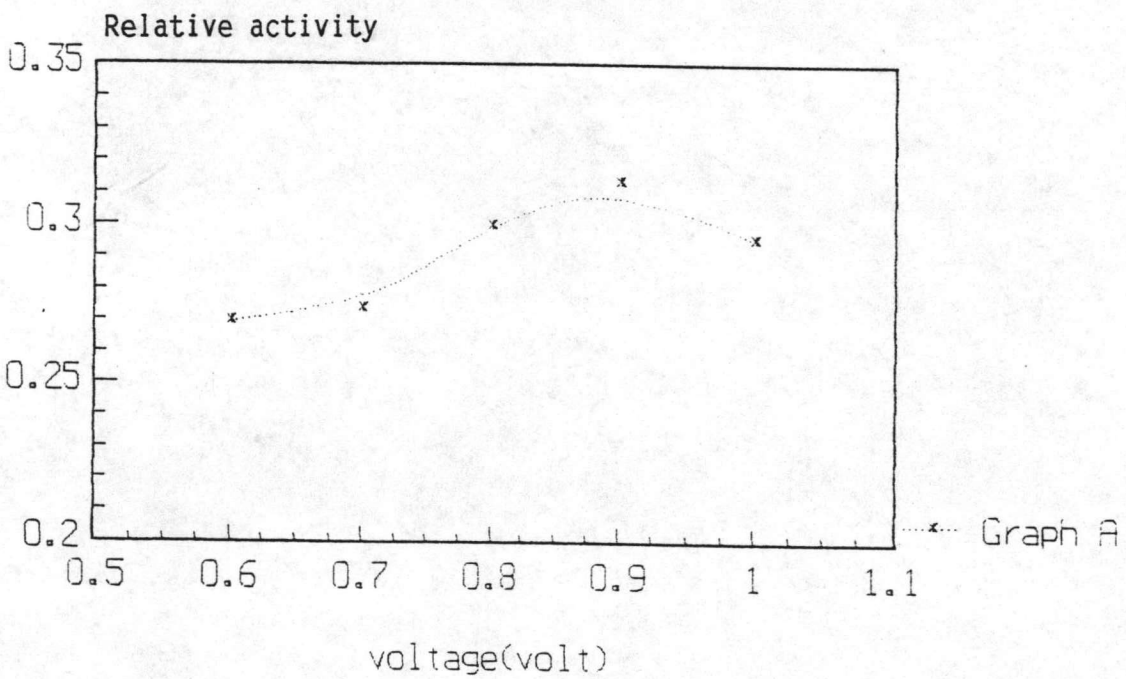
หลังการปรับปรุงดังกล่าว พบว่าฟิลม์ที่เกิดขึ้นบนขั้วแอโนดมีลักษณะสม่ำเสมอ เกิดขึ้นเต็มพื้นที่ ดังแสดงในรูปที่ 5.14

ผลของตัวแปรสำคัญที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการไบแอสอิเล็กโทรด

ในการศึกษาผลของแรงดันที่ใช้ไบแอสได้ทำการเปลี่ยนแปลงค่าแรงดันทั้งหมด 5 ค่า คือ 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ1.0 โวลต์ ตามลำดับ โดยใช้เวลาในการตรึงเอนไซม์ 10 นาที เพื่อให้มีปริมาณเอนไซม์ถูกตรึงบนอิเล็กโทรดมากพอที่จะใช้ในการวัดน้ำตาลกลูโคสได้ ผลการทดลองได้แสดงไว้ในรูปที่ 5.15 โดยการวัดปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้มีขั้นตอนดังแสดงไว้ในหัวข้อ 2.3



รูปที่ 5.14 ฟิลม์ที่เกิดขึ้นเมื่อขั้วคาโทดมีพื้นที่มากกว่าขั้วแอโนด



รูปที่ 5.15 ผลของค่าแรงดันไบแอสต่อปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้

ลักษณะของฟิลม์ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้แรงดันค่าต่างๆ เป็นดังนี้

1. แรงดัน 0.6 โวลต์ ฟิลม์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเรียบมีสีเหลืองอ่อน
2. แรงดัน 0.7 โวลต์ ฟิลม์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเรียบมีสีน้ำตาลอ่อน
3. แรงดัน 0.8 โวลต์ ฟิลม์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเรียบมีสีน้ำตาลเข้ม
4. แรงดัน 0.9 โวลต์ ฟิลม์ที่เกิดขึ้นไม่สม่ำเสมอมีสีน้ำตาลเข้ม
5. แรงดัน 1.0 โวลต์ ฟิลม์ที่เกิดขึ้นไม่สม่ำเสมอมีสีน้ำตาลเข้ม

จากรูปที่ 5.15 จะเห็นได้ว่า ค่าแรงดันที่ทำการตรึงเอนไซม์ได้มากที่สุดอยู่ที่ 0.9 โวลต์ แต่เมื่อพิจารณาถึงความสม่ำเสมอของฟิลม์ที่เกิดขึ้นแล้ว พบว่าแรงดันที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ ควรจะเป็นที่ 0.8 โวลต์

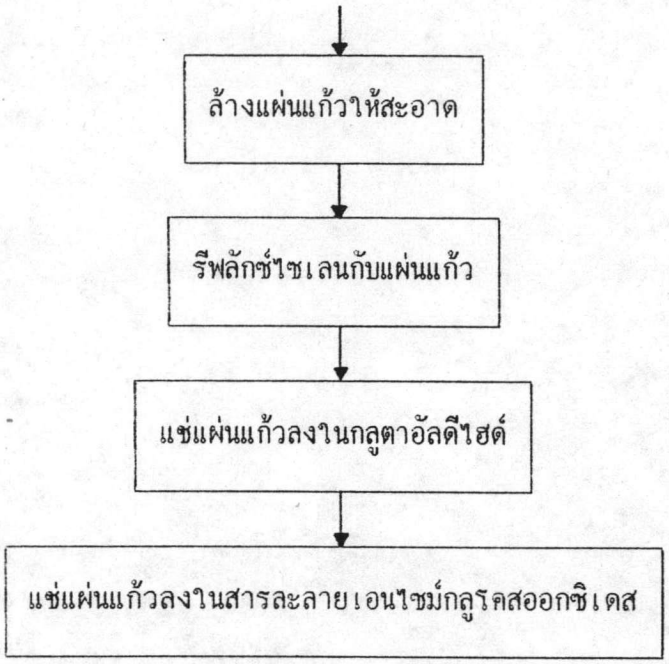
สรุปก็คือ ในการตรึงเอนไซม์ จะใช้แรงดันในการไบแอสอิเล็กโตรด 0.8 โวลต์และใช้เวลาในการตรึงเอนไซม์ 10 นาที ซึ่งฟิลม์ที่เกิดขึ้นจะมีความสม่ำเสมอดี

5.3 การตรึงเอนไซม์แบบการสร้างพันธะเคมีโดยใช้ไซเลน (silane) และกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)

กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารพังก์ชันคู่ (bi-function) ซึ่งสามารถสร้างพันธะโควาเลนซ์ระหว่างไซเลนกับเอนไซม์ พันธะดังกล่าวจะมีความคงทน ทำให้เซนเซอร์ที่ตรึงเอนไซม์โดยวิธีมีความคงทนในการใช้งาน โดยเอนไซม์จะไม่หลุดจากผิวอิเล็กโทรดโดยง่าย

ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์โดยวิธีนี้แสดงได้ดังรูป 5.16 โดยในขั้นแรก จะใช้แผ่นแก้วสไลด์เป็นฐานในการตรึงเอนไซม์

เนื่องจากที่ผิวด้านนอกของแผ่นแก้วสไลด์ จะมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เกาะอยู่เสมอ ดังนั้น เมื่อนำแผ่นแก้วสไลด์มารีฟลักซ์กับไซเลน จะเกิดปฏิกิริยาเคมีขึ้น โดยสามารถอธิบายได้จากสมการที่ (5.9)



รูปที่ 5.16 ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์โดยใช้ไซเลน และกลูตาอัลดีไฮด์

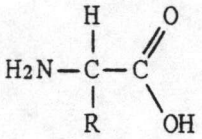
$$G\text{–}OH + H_2C_2O\text{–}Si(OC_2H_5)_2\text{–}(CH_2)_3\text{–}NH_2 \text{ ------> } G\text{–}O\text{–}Si(OC_2H_5)_2\text{–}(CH_2)_3\text{–}NH_2 \quad (5.9)$$

แผ่นแก้ว ไซเลน

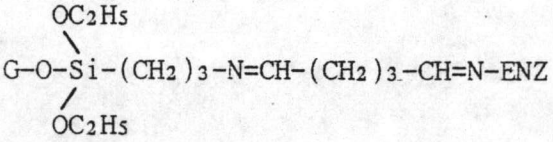
กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังนี้

$$OHCCH_2CH_2CH_2CHO$$

เอนไซม์โดยทั่วไปจะมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังนี้



เมื่อนำแผ่นแก้วสไลด์ที่ผ่านการรีฟลักซ์กับไซเลน มาแช่ในสารละลายที่มีกลูตาอัลดีไฮด์และเอนไซม์ตามลำดับ จะได้ผลิตภัณฑ์ดังนี้



จะเห็นได้ว่า จะมีชั้นของเอนไซม์เกาะติดอยู่ที่ผิวด้านนอกของแผ่นแก้วสไลด์ โดยมีกลูตาอัลดีไฮด์ และไซเลนเป็นตัวเชื่อม

ในการตรวจสอบว่ามีปริมาณเอนไซม์ถูกตรึงอยู่บนผิวอิเล็กโตรดมากน้อยเพียงใด ในที่นี้ ใช้วิธีการวัดปริมาณสีที่เปลี่ยนแปลงไปของรงควัตถุ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งวิธีการวัดได้กล่าวไว้ในหัวข้อ2.3 โดยการวัดจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีที่เกิดขึ้น ถ้าหากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าสูง แสดงว่ามีเอนไซม์ถูกตรึงอยู่มาก แต่ถ้าหากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าน้อยแสดงว่ามีปริมาณเอนไซม์ถูกตรึงอยู่น้อย

5.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นไซเลน และระยะเวลาที่ใช้ในการรีฟลักซ์

ในขั้นตอนแรก จะศึกษาผลของความเข้มข้นของไซเลน และระยะเวลาที่ใช้ในการรีฟลักซ์ต่อปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้บนผิวอิเล็กโทรด ขั้นตอนการทดลองแสดงดังรูป 5.17

1. รีฟลักซ์แผ่นแก้วสไลด์ในไซเลนความเข้มข้น 1% และ 5% เป็นเวลา 1,2,3,4 และ5 ชั่วโมง
2. นำแผ่นแก้วสไลด์จากขั้นตอนที่ 1.ไปแช่ในสารละลายกลูตาอัลดีไฮด์ 1% 6 ชั่วโมง
3. นำแผ่นแก้วสไลด์จากขั้นตอนที่ 2.ไปแช่ในสารละลายเอนไซม์ 1.24 mg/dl 6 ชั่วโมง

นำแผ่นแก้วสไลด์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.3

รูปที่ 5.17 ขั้นตอนการศึกษาผลของความเข้มข้นไซเลน และระยะเวลาในการรีฟลักซ์

ผลการทดลองแสดงได้ดังรูป 5.18

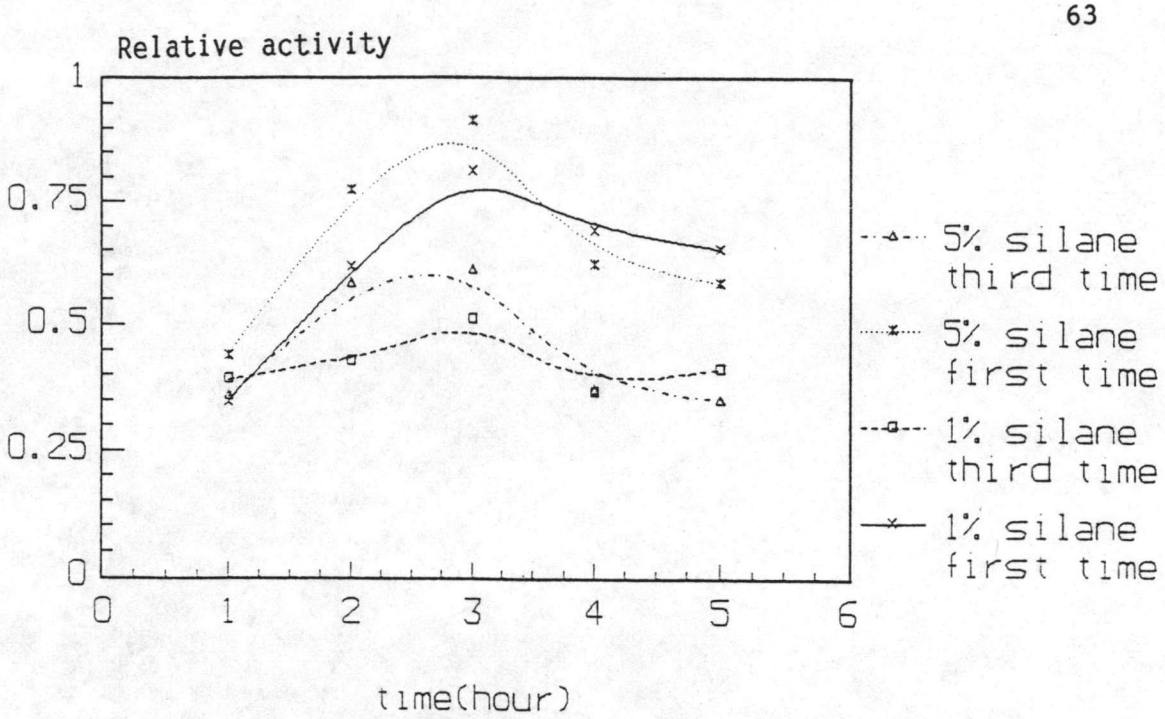
จากรูป 5.18 สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในครั้งแรก จะมีค่าลดลงในการวัดครั้งต่อๆ ไป ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก

1.1 มีเอนไซม์บางส่วนหลุดจากผิวแก้ว ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก การล้างอิเล็กโทรดในการวัดแต่ละครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์

1.2 อาจยังคงมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการวัดครั้งแรก จับอยู่ที่ส่วนที่สามารถทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ (active sites) ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดีเท่าที่ควร

2. ที่ความเข้มข้นของไซเลน 5% จะมีค่าการดูดกลืนแสง ที่สูงกว่าที่ 1% เมื่อใช้เวลาการรีฟลักซ์เท่ากัน อาจเป็นผลเนื่องมาจากที่ไซเลน 5% มีโอกาสสร้างพันธะโควาเลนซ์กับผิวแก้วได้มากกว่า



รูปที่ 5.18 ผลของความเข้มข้นของไซเลน และระยะเวลาในการรีฟลักซ์ต่อปริมาณของเอนไซม์ที่ตรึงได้

—*— คือ แผ่นแก้วสไลด์ที่ทำการตรึงเอนไซม์ โดยใช้ไซเลน 1% และทำการวัดปริมาณเอนไซม์ครั้งแรก

--□-- คือ แผ่นแก้วสไลด์ที่ทำการตรึงเอนไซม์ โดยใช้ไซเลน 1% และทำการวัดปริมาณเอนไซม์ครั้งที่ 3

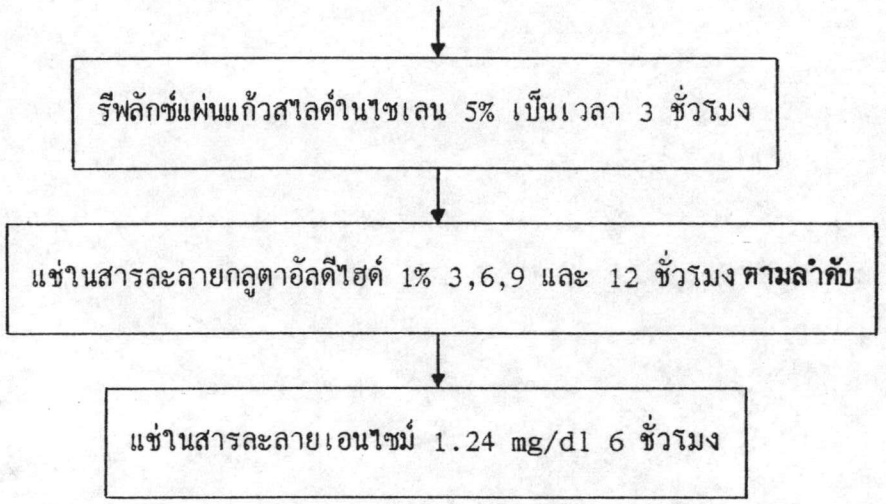
··*·· คือ แผ่นแก้วสไลด์ที่ทำการตรึงเอนไซม์ โดยใช้ไซเลน 5% และทำการวัดปริมาณเอนไซม์ครั้งแรก

--△-- คือ แผ่นแก้วสไลด์ที่ทำการตรึงเอนไซม์ โดยใช้ไซเลน 5% และทำการวัดปริมาณเอนไซม์ครั้งที่ 3

3. เวลาที่เหมาะสมในการรีฟลักซ์ผิวแก้วด้วยไซเลน 1% และ 5% คือ 3 ชั่วโมง เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงมีแนวโน้มจะลดลง หรือเกือบคงที่ ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) ที่ผิวแก้ว กับหมู่อะมิโน (amino group) ของไซเลนถึงจุดสมดุล

5.3.2 การศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ในสารละลายกลูตาอัลดีไฮด์

ในการทดลองนี้ จะทำการเปลี่ยนแปลงเวลาในการแช่ในสารละลายกลูตาอัลดีไฮด์ 1% เป็น 3,6,9 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยการรีฟลักซ์ทำที่ความเข้มข้นไซเลน 5% เป็น เวลา 3 ชั่วโมง ในขณะที่ใช้เวลาแช่ในสารละลายเอนไซม์ 6 ชั่วโมง ขั้นตอนการทดลองแสดงดังรูป 5.19



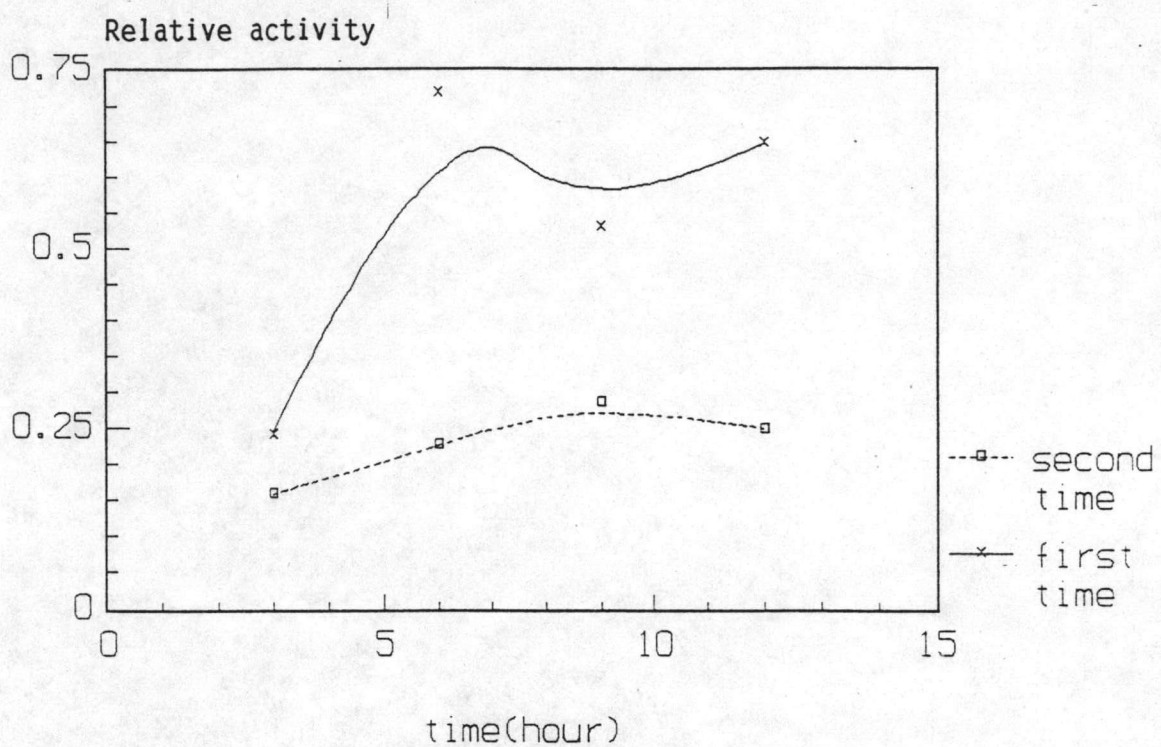
รูปที่ 5.19 ขั้นตอนการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ในสารละลายกลูตาอัลดีไฮด์

ผลการทดลองแสดงได้ดังรูป 5.20

จากรูปที่ 5.20 จะเห็นได้ว่า ระยะเวลาในการแช่ในกลูตาอัลดีไฮด์ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงดีที่สุดคือ 6 ชั่วโมง

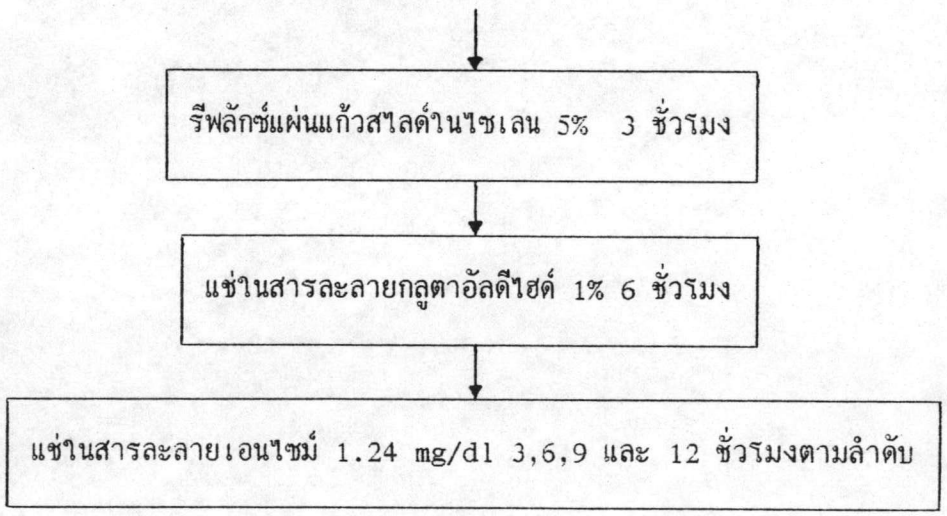
5.3.3 การศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์

ในการทดลองนี้ จะทำการเปลี่ยนแปลงเวลาในการตรึงเอนไซม์เป็น 3, 6,9 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยความเข้มข้นของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 1.24 mg/dl ในขณะที่ใช้เวลาแช่ในสารละลายกลูตาอัลดีไฮด์เป็น 6 ชั่วโมง ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์มีค่าเท่ากับ 1% การรีฟลักซ์ทำในไซเลน 5% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง



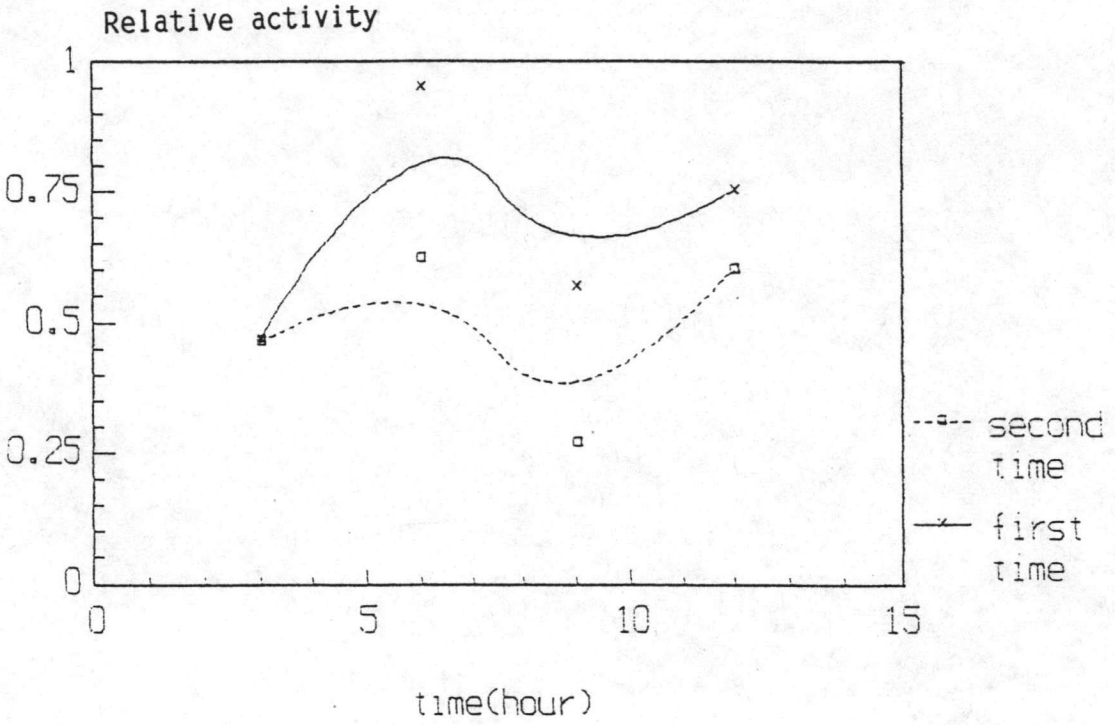
รูปที่ 5.20 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับสารละลายกลูตาอัลดีไฮด์

ขั้นตอนการทดลองแสดงดังรูป 5.21



รูปที่ 5.21 ขั้นตอนการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ในสารละลายเอนไซม์

ผลการทดลองแสดงได้ดังรูป 5.22



รูปที่ 5.22 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์

—x— คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เมื่อทำการวัดครั้งแรก

--□-- คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เมื่อทำการวัดครั้งที่สอง

จากรูปที่ 5.22 จะเห็นได้ว่า ระยะเวลาในการแช่ในเอนไซม์ ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงดีที่สุดคือ 6 ชั่วโมง

จากการทดลองทั้งหมด สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ ได้ดังนี้

1. เวลาที่ใช้ในการรีฟลักซ์แผ่นแก้วสไลด์ ในสารละลายไซเลน 5% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

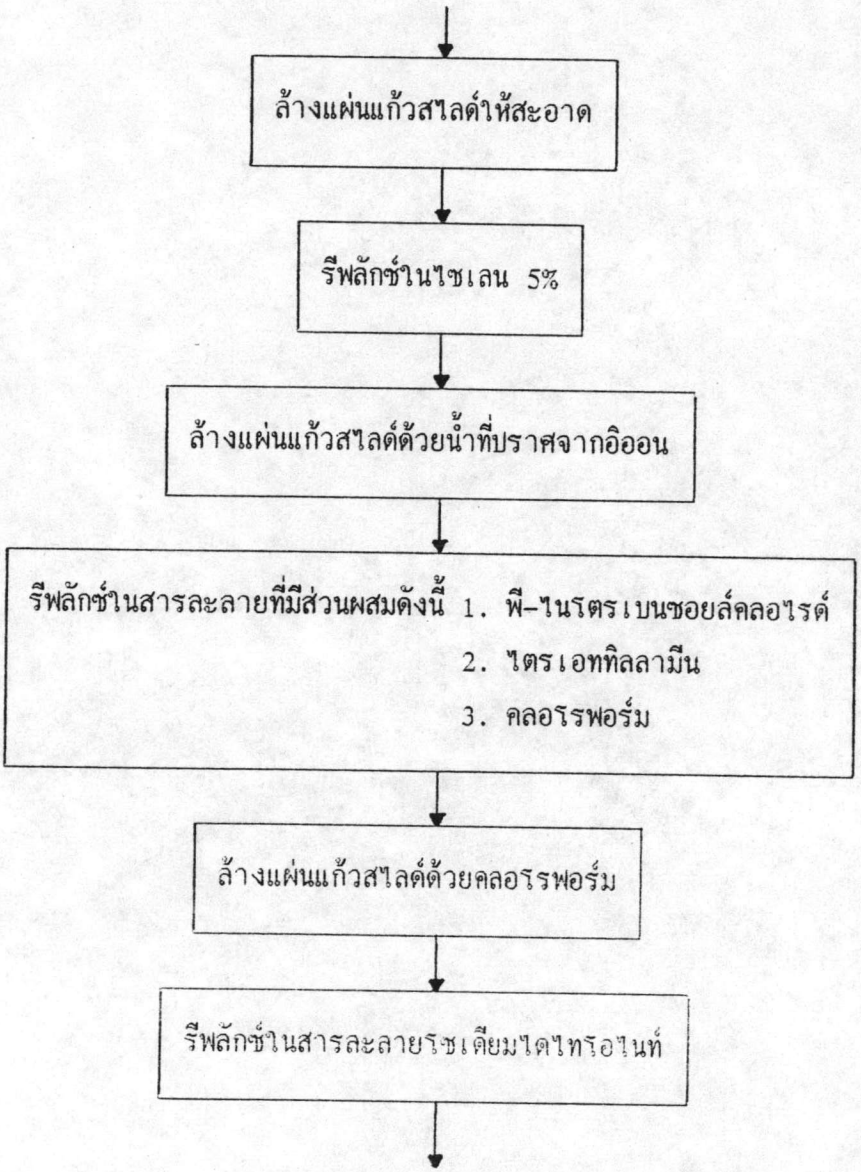
2. เวลาที่ใช้ในการที่แผ่นแก้วสไลด์ กับสารละลายกลูตาอัลดีไฮด์ 1% ทำปฏิกิริยากันเท่ากับ 6 ชั่วโมง

3. เวลาที่ใช้แช่ในสารละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 1.24 mg/dl เป็น 6 ชั่วโมง

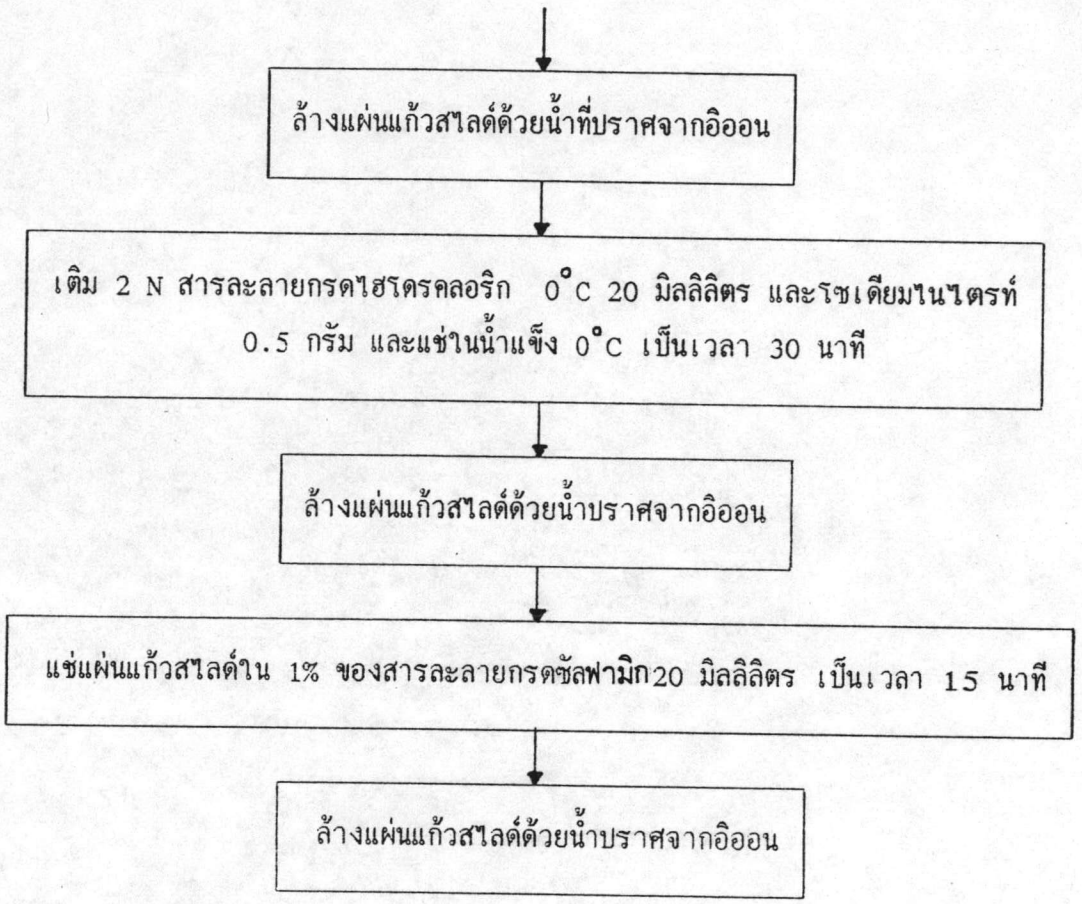
5.4 การตรึงเอนไซม์แบบการสร้างพันธะเคมีโดยใช้ไซเลน (silane) และพี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ (p-nitrobenzoylchloride)

การตรึงเอนไซม์โดยวิธีนี้ ยังคงใช้สารไซเลนในการทำปฏิกิริยากับแผ่นแก้วสไลด์อยู่เช่นเดียวกับการตรึงเอนไซม์ในหัวข้อที่แล้ว แต่จะแตกต่างกันที่ จุดประสงค์ของการตรึงเอนไซม์วิธีนี้คือ จะทำให้บริเวณผิวนอกสุดของแผ่นแก้วสไลด์เกิดมีเกลือของไดอะโซเนียม (diazonium salt) ขึ้น (diazotized glass) ซึ่งเกลือของไดอะโซเนียมนี้ จะสามารถสร้างพันธะโควาเลนซ์กับเอนไซม์ได้ โดยเอนไซม์จะยังคงมีแอกติวิตี้ในการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสอยู่

ขั้นตอนการเตรียมผิวกระจกให้มีหมู่ไดอะไทซ์ที่ผิว (diazotized glass) แสดงไว้ในรูปที่ 5.23


ล้างแผ่นแก้วสไลด์ให้สะอาด
รีฟลักซ์ในไซเลน 5%
ล้างแผ่นแก้วสไลด์ด้วยน้ำที่ปราศจากอิออน
รีฟลักซ์ในสารละลายที่มีส่วนผสมดังนี้ 1. พี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์
2. ไตรเอทธิลลามีน
3. คลอโรฟอร์ม
ล้างแผ่นแก้วสไลด์ด้วยคลอโรฟอร์ม
รีฟลักซ์ในสารละลายโซเดียมไดไทโอไนท์

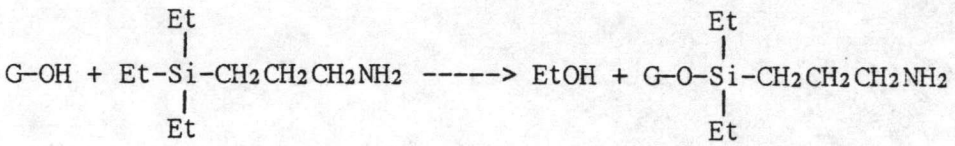
ต่อ



รูปที่ 5.23 ขั้นตอนการเตรียมแผ่นกระจกให้มีหมู่ไดอะโทซ์ที่ผิว

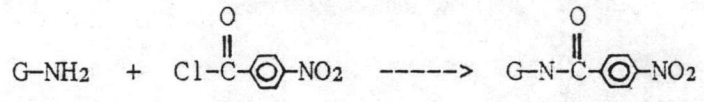
ปฏิกิริยาสามารถอธิบายได้ด้วยสมการเคมีดังนี้

1. แผ่นแก้วสไลด์เมื่อถูกรีฟลักซ์ในไซเลน จะเกิดหมู่อะมิโนขึ้นที่ผิวด้านนอก



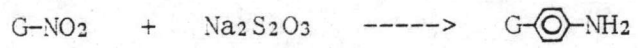
แผ่นสไลด์ ไซเลน [G–NH_2]

2. เมื่อนำแผ่นแก้วสไลด์ที่ได้จากข้อ 1 มาทำปฏิกิริยาต่อกับพี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีหมู่ NO_2 ที่บริเวณผิวนอกของแผ่นสไลด์



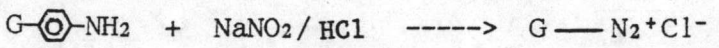
พี-ไนโตรเบนซอยล์ คลอไรด์ [G–NO_2]

3. เมื่อนำแผ่นสไลด์ที่ได้ ทำปฏิกิริยาต่อกับโซเดียมไดไทโอไนท์ จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ผิวนอกเป็นหมู่อะโรมาติกเอไมน์



โซเดียมไดไทโอไนท์

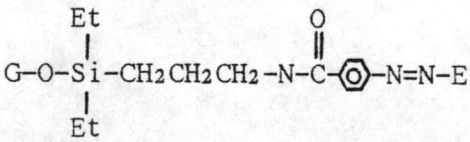
4. เมื่อนำผลิตภัณฑ์ในข้อ 3 มากระตุ้นด้วยกรดไนตรัส จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีเกลือของไดอะโซเนียมที่บริเวณผิวนอก



กรดไฮโดรคลอริก แผ่นสไลด์ที่มีหมู่ไดอะไทซ์ที่ผิว

เมื่อนำแผ่นแก้วสไลด์ที่ได้จากปฏิกิริยาในข้อ 4 มาแช่ในสารละลายเอนไซม์ เอนไซม์จะสร้างพันธะโควาเลนซ์กับเกลือไดอะโซเนียม ที่อยู่บนผิวของแผ่นแก้วสไลด์ โดยเอนไซม์จะยังคงมีแอกทิวิตี้ในการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสต่อไป ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังนี้

เอนไซม์



5.4.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของพี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไดไทโอไนท์ ต่อปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้

ปริมาณความเข้มข้นของพี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ และโซเดียมไดไทโอไนท์ที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้

1. 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อ แผ่นแก้วสไลด์ 1 กรัม
2. 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อ แผ่นแก้วสไลด์ 1 กรัม
3. 5.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อ แผ่นแก้วสไลด์ 1 กรัม
4. 9.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อ แผ่นแก้วสไลด์ 1 กรัม

โดยปริมาณสารเคมีที่ใช้แสดงไว้ในตารางที่ 5.1

รีฟลักซ์ครั้งที่ 1

ครั้งที่	น้ำหนักแผ่นแก้ว (กรัม)	พี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ (มิลลิกรัม)	ไตรเอทธิลลามีน (มิลลิลิตร)	คลอโรฟอร์ม (มิลลิลิตร)
1	7.3	493	3.5	49
2	8.3	556	0.4	36.6
3	6.7	750	0.5	20
4	8.1	1660	1.4	20

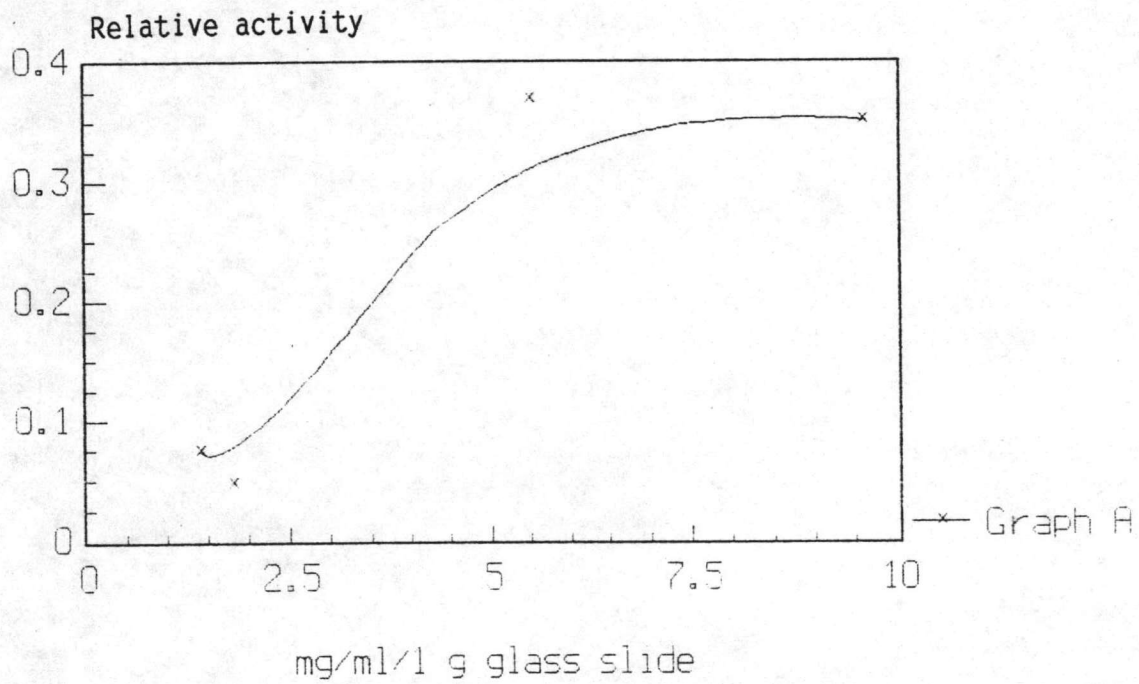
รีฟลักซ์ครั้งที่ 2

ครั้งที่	น้ำหนักแผ่นแก้ว (กรัม)	โซเดียมไดไทรอไนท์ (มิลลิกรัม)	น้ำ (มิลลิลิตร)
1	7.3	493	49
2	8.3	556	36.6
3	6.7	750	20
4	8.1	1660	20

ตารางที่ 5.1 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการรีฟลักซ์

ความเข้มข้นของพี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ และโซเดียมไดไทรอไนท์ คำนวณโดยใช้คลอโรฟอร์ม และน้ำ ตามลำดับ ส่วนปริมาณของไตรเอททิลลามีนนั้น จะใช้ในอัตราส่วนประมาณ 0.7 มิลลิลิตร ต่อ พี-ไนโตรเบนซอยล์หนัก 1 กรัม

ในการทดลอง จะทำแผ่นสไลด์ที่มีหมู่ไดอะไทซ์ที่ผิว ตามขั้นตอนที่แสดงไว้ในรูปที่ 5.22 โดยแบ่งความเข้มข้นของพี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ และโซเดียมไดไทรอไนท์ เป็น 4 ความเข้มข้น ตามที่ได้กล่าวไว้แล้ว จากนั้น จึงนำแผ่นสไลด์ที่มีหมู่ไดอะไทซ์ที่ผิวมาแช่ในสารละลายเอนไซม์ 1.24 mg/dl แล้วจึงนำแผ่นแก้วสไลด์ที่ได้ ไปทำการวัดปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้ ผลการทดลองแสดงในรูป 5.24



รูป 5.24 ผลของความเข้มข้นของพี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ และโซเดียมไดไทรอไนท์

จากรูป 5.24 สามารถสรุปได้ดังนี้ คือเมื่อใช้ความเข้มข้นของ พี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ และสารละลายโซเดียมไดไทรอไนท์ 9.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อ แผ่นแก้ว 1 กรัม จะเห็นได้ว่าปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้มีแนวโน้มที่จะมีค่าอิ่มตัว

สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ โดยใช้แผ่นแก้วที่มีเกลือไดอะโซเนียมที่ผิวได้ดังนี้ คือ

1. จะใช้ปริมาณความเข้มข้นของพี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ และสารละลายโซเดียม ไดไทโอไนท์ 9.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อ แผ่นแก้วสไลด์หนัก 1 กรัม ในการทำแผ่นแก้วให้มีเกลือไดอะโซเนียมที่ผิวแก้ว

2. ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์เป็น 3 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 1.24 mg/dl

<u>สรุป</u>

1. สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์แบบผัง (entrapment) จะใช้ส่วนทำปฏิกิริยาที่มีส่วนผสมดังนี้

1.1	เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส	50	มิลลิกรัม
1.2	สารส่งผ่านอิเล็กตรอน ซึ่งในที่นี้ใช้สารเฟอร์โรซีน	18.6	มิลลิกรัม
1.3	อีพ็อกซี	50	มิลลิกรัม
1.4	เอทธิลแอลกอฮอล์	0.5	มิลลิลิตร
1.5	สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมล	0.5	มิลลิลิตร

2. สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์แบบ อิเล็กโตรโพลีเมอร์ไรเซชั่น จะใช้ส่วนทำปฏิกิริยาที่มีส่วนผสมดังนี้

2.1 สารละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 สารละลายโพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.1โมล 4 มิลลิลิตร

2.3 สารโพลีไพโรล (polypyrrole) 20 ไมโครลิตร

ในการตรึงเอนไซม์ จะใช้แรงดันในการไบแอสอิเล็กโตรด 0.8 โวลต์ และใช้เวลาในการตรึงเอนไซม์ 10 นาที

3. สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์แบบการสร้างพันธะเคมี โดยใช้ไซเลนและกลูตาอัลดีไฮด์มีดังนี้

3.1 เวลาที่ใช้ในการรีฟลักซ์แผ่นแก้วสไลด์ ในสารละลายไซเลน 5% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.2 เวลาที่ใช้ในการที่แผ่นแก้วสไลด์ กับสารละลายกลูตาอัลดีไฮด์ 1% ทำปฏิกิริยากันเท่ากับ 6 ชั่วโมง

3.3 เวลาที่ใช้แช่ในสารละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสความเข้มข้น 1.24 mg/dl เป็น 6 ชั่วโมง

4. สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์แบบการสร้างพันธะเคมี โดยใช้ไซเลนและพี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ มีดังนี้

4.1 ใช้ปริมาณความเข้มข้นของ พี-ไนโตรเบนซอยล์คลอไรด์ และสารละลายโซเดียม ไดไทโอไนท์ 9.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อ แผ่นแก้วสไลด์หนัก 1 กรัม ในการทำแผ่นแก้วให้มีเกลือไดอะโซเนียมที่ผิว

4.2 ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์เป็น 3 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 1.24 mg/dl