วราภรณ์ เริงฤทธิ์ : การตรึงเอนไซม์ออกซิเดสในไบโอเซนเซอร์ด้วยท่อนาโนรูพรุนและการตรวจหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยวิธีทางไฟฟ้าเคมี (A CAPPED NANOPOROUS SPONGE FOR DURABLE OXIDASE BIOSENSORS AND ESTABLISHMENT OF AN ELECTROCHEMICAL READOUT FOR ENZYME ACTIVITY ASSAYS). อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์, 203 หน้า

งานวิจัยนี้ออกแบบการประดิษฐ์ไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจวัดกลูโคสด้วยเทคนิควิเคราะห์แอมเพอร์โรเมทรีโดยใช้ท่อนาโนคาร์บอนซึ่งมีรูพรุนในการตรึงเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ซึ่งการตรึงเอนไซม์บนผิวหน้าอิเล็กโทรดโลหะแพลตตินัมหรือทองนั้นจะใช้วิธีการหยดท่อนาโนคาร์บอนและปล่อยให้แห้ง เพื่อให้ได้โครงข่ายของท่อนาโนคาร์บอนที่หนาแน่นและยึดติดกับอิเล็กโทรดได้ดี เมื่อท่อนาโนคาร์บอนที่หยดลงบนผิวหน้าอิเล็กโทรดแห้งแล้ว จากนั้นจึงหยดกลูโคสออกซิเดสเอนไซม์แล้วปล่อยให้แห้ง ในขั้นตอนสุดท้ายทำการปิดผิวหน้าของอิเล็กโทรดด้วยโพลิเมอร์ เพื่อเป็นการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรดให้ได้นานที่สุดระหว่างการทดลอง กลูโคสไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น (CNT/GOx/EDP) ถูกนำมาใช้เป็นตัวตรวจวัดกลูโคสแบบแอมเพอร์โรเมทรี จากการทดลองพบว่าไบโอเซนเซอร์ชนิดนี้สามารถวัดความเข้มข้นของกลูโคสในช่วงที่สมการเป็นเส้นตรงได้สูงถึง 40 มิลลิโมลาร์ และสามารถวัดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ต่ำที่สุดที่ 50 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้เมื่อนำไปใช้ในการทดลองในระบบโฟลอินเจคชันสำหรับตรวจวัดกลูโคสเพื่อทดสอบความแข็งแรงของโพลิเมอร์ที่ใช้สำหรับปิดผิวหน้าอิเล็กโทรด พบว่าไบโอเซนเซอร์นี้สามารถวัดความเข้มข้นของกลูโคสที่ได้อย่างต่อเนื่อง ในระยะเวลามากกว่า 100 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่องเมื่ออยู่ในรูพรุนของท่อนาโนคาร์บอนและโพลิเมอร์ที่ใช้ปิดผิวหน้าช่วยป้องกันไม่ให้เอนไซม์สูญหายออกไปจากผิวหน้าอิเล็กโทรดระหว่างการทดลอง

การตรวจหาปฏิกิริยาของเอนไซม์บีตา-เอ็น-อะซิติลกลูโคซะมินิเดส (β-N-acetylglucosaminidase) ที่ทำปฏิกิริยากับพาราเมทิลอัมเบอริเฟอริล-เอ็น-อะซิติล-บีตา-ดี-กลูโคซะมีนสับเสรต ด้วยวิธีทางไฟฟ้าเคมีแบบแอมเพอร์โรเมทรี พบว่าเมื่อสับเสรตดังกล่าวเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้วจะให้สารที่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ เทคนิคทางไฟฟ้าเคมีที่ใช้สำหรับ

ตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสับเสรตคือการวัดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบแอมเพอร์โรเมทรี ด้วยอิเล็กโทรดใช้งานเพชรที่เจือโบรอน (Boron doped diamond electrode (BDD) ซึ่งให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมกับอิเล็กโทรดใช้งานในขณะที่ตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยา ในการทดลองจะแสดงสัญญาณออกมาในรูปของกระแสไฟฟ้าผ่านทางคอมพิวเตอร์ควบคุม ทำให้ทราบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับเสรตและสารที่เกิดขึ้นยังสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ กระแสไฟฟ้าที่วัดได้จากการเกิดปฏิกิริยานั้นจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสับเสรต นอกจากนี้ยังสามารถสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาและความเข้มข้นของสับสเตรทแบบไฮเปอร์โบลาฟังก์ชันได้ ซึ่งเป็นไปตามความสัมพันธ์ของสมการไมเคิลลิส เมนเทน (Michaelis-Menten equation)

การศึกษากลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซะมินิเดส (*β-N*-acetylglucosaminidase) จากเชื้อ*Vibrio harveyi* ที่มีผลต่อสับเสรตพาราเมทิลอัมเบอริเฟอริล-เอ็น-อะซิติล-บีตา-ดี-กลูโคซะมีน (4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl-*β*-D-glucosaminide) โดยการวัดความเข้มของการวาวแสง (fluorescence) ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของพาราเมทิลอัมเบอริเฟอริล จากผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ก่อนเข้าสู่สถานะคงที่ พบว่ากลไกในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสับสเตรทดังกล่าวมาแล้วนั้นเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสองขั้นตอนคือ ขั้นแรกเป็นการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับเสรต ขั้นที่สองเป็นการสลายพันธะระหว่าง 4-methylumbelliferyl กับ *N*-acetyl-*β*-D-glucosaminide ด้วยค่า K_d (dissociate constant) เท่ากับ 99 ไมโครโมลาร์ ค่าคงที่ k_{obs} เท่ากับ 53 ± 4 ต่อวินาที และค่าคงที่ k_{cat} เท่ากับ 11.5 ต่อวินาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา อรวรรณ์ เธียรฤทธิ์

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

WARAPORN RERNGLIT : A CAPPED NANOPOROUS SPONGE FOR DURABLE OXIDASE BIOSENSORS AND ESTABLISHMENT OF AN ELECTROCHEMICAL READOUT FOR ENZYME ACTIVITY ASSAYS. THESIS ADVISOR : PROF. WIPA SUGINTA, Ph.D. 203 PP.

BIOSENSORS/CARBON NANOTUBES/IMMOBILIZATION/AMPEROMETRIC DETECTION/ENZYME ACTIVITY/CATALYTIC MECHANISM

This thesis approached advancements in the architecture of amperometric glucose biosensors with utilization of bare carbon nanotube (CNT) sensor deposits as a nanoporous immobilization matrix for glucose oxidase (GOx). A simple drop & dry procedure as used to create the dense and well-adhering conductive network of CNT nanowires on platinum (Pt) or gold (Au) disk electrodes. Fresh CNT surface films were then loaded in a subsequent drop & dry step with GOx as the biocatalytic unit. In a final step, an electrodeposition paint (EDP) was cathodically deposited as a biosensor top coat to prevent diffusional GOx loss during the desired long-term measurements and related prolonged measuring buffer exposure. CNT/GOx/EDP glucose biosensors have been tested and calibrated via common amperometry testing. The key performance characteristics of the generated biosensors were a literature-competitive glucose response linearity up to about 40 mM, a detection limit down to about 50 µM, and over 100 hours of stable glucose signaling during continuous operation in an electrochemical flow cell, which is a remarkable CNT/GOx biolayer durability. The pronounced signal stability evidenced both the ability of the EDP glaze to block protein molecule escape from the trapping CNT matrix and decent CNT sponge biocompatibility.

Also established was a non-optical amperometric assay for the monitoring of *β*-*N*-acetylglucosaminidase action on a *(*4-MU)-labeled substrate. Here, advantage was taken of the redox activity of 4-MU, which creates electrochemical signals that can be detected on properly-charged noble metal or carbon working electrodes. Anodic 4-MU amperometry was operated in a reaction container in which enzyme and 4-MU-labeled substrate were brought together, while keeping a boron-doped diamond disk electrode at the 4-MU detection potential of + 700 mV vs. reference. In "real time" current recordings 4-MU liberation due to enzymatic substrate cleavage in the reaction buffer was visualized as a gradually increasing current signal and data from variations of substrate buffer levels made possible the construction of Michaelis Menten-type of enzyme activity plots.

Finally, the catalytic mechanism of the reaction of *β*-N-acetylglucosaminidase from *Vibrio harveyi* with 4-methylumbelliferyl-*β*-N-acetyl-D-glucosaminide was inspected with a fluorimetric biochemical assay, executed in the stop-flow mode for fast kinetic data assessment of the enzymatic substrate hydrolysis reaction and related liberation of the fluorescent product 4-methylumbelliferone. From the result at pre-steady state kinetics found two-step process was revealed for the biocatalysis, first enzyme-substrate binding and second the bond break between 4-methylumbelliferyl and *N*-acetyl-*β*-D-glucosaminide with K_d (dissociate constant) is 99 μM, k_{obs} is 53 ± 4 s^{-1} and k_{cat} is 11.5 s^{-1}.

School of Chemistry

Academic Year 2017

Student's Signature Waraporn Rerngkit

Advisor's Signature Wipa Suw