การพัฒนาไบโอเซนเซอร์ด้วยเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวป์-ไคโตซานเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนด้วยแลคเคส

Development of a Biosensor Based on the Matrix of Carbon Nanotubes-Chitosan Composite for Laccase-Catalyzed Oxygen Reduction

ยุวากร เสนศรี[1] เสนอ ชัยรัมย์[1] ดวงใจ นาคะปรีชา[2, 3] และ มะลิวรรณ อมตธงไชย[1, 3]*

[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[3]ห้องปฏิบัติการนวัตกรรม-วิจัยการไหลเพื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Yuwakorn Sensri[1], Sanoe Chairam[1], Duangjai Nacapricha[2, 3] and Maliwan Amatatongchai[1, 3]*

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University.

[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University.

[3]Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs)

บทคัดย่อ

วัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานเป็นเมทริกซ์ที่เหมาะในการนำไปพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพเนื่องจากมีความเสถียรสูง สามารถเข้ากับสารชีวโมเลกุลและนำไฟฟ้าได้ดี งานวิจัยนี้เสนอการพัฒนาสภาพไวและความจำเพาะเจาะจงของไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน โดยการตรึงเอนไซม์แลคเคสในฟิล์มของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน เอนไซม์แลคเคสถูกตรึงบนพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนบนวัสดุเชิงประกอบของคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานและสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีน ทำให้สามารถใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดออกซิเจน ได้ศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี ในสารละลายซิเทรตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ที่ใช้เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกื้อหนุน โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และแพลทินัมเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย พบว่าออกซิเจนเกิดรีดักชันที่ศักย์ไฟฟ้า -0.35 โวลต์ (เมื่อเทียบกับ Ag/AgCl) นอกจากนี้ได้ศึกษาความเสถียรของไบโอเซนต์เซอร์ที่ได้พัฒนาขึ้น

คำสำคัญ : แลคเคส ไคโตซาน คาร์บอนนาโนทิวป์ ออกซิเจนรีดักชัน

***Corresponding author.** E-mail: scmaliam@ubu.ac.th, m_amatatongchai@yahoo.com

Abstract

The carbon nanotubes-chitosan (CNT-CS) composite provides a suitable biosensing matrix due to its high stability, good biocompatibility, and good conductivity. Development of a sensitive and selective biosensor was proposed by entrapping laccase enzyme into the composite film for detection of oxygen reduction. The nano-composite of CNT-CS could be conveniently cast on the glassy carbon (GC) electrode surfaces. With the aid of the CNT-CS composite and bovine serum albumin (BSA), laccase was then immobilized on the nanostructure film to form an oxygen sensor. Electrochemical reduction of oxygen was studied at the developed biosensor using cyclic voltammetry (CV). The GC/CNT-CS/laccase/BSA electrode was used as a working electrode, Ag/AgCl as a reference electrode and Pt wire as a counter electrode. Cyclic votammograms of oxygen were measured in a 0.1 M citrate buffer pH 5.0. The reduction wave was observed at -0.35 V (Vs Ag/AgCl). The stability was also studied.

Keywords : laccase, chitosan, carbon nanotubes, oxygen reduction

บทนำ

ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) เป็นอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างเฉพาะเจาะจง และใช้ตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ ได้หลากหลายชนิด โดยทั่วไปไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วยอุปกรณ์ 2 ส่วนคือตัวแปลงสัญญาณ และสารชีวภาพ ความจำเพาะของไบโอเซนเซอร์เป็นผลมาจากความจำเพาะของไบโอรีเซฟเตอร์ ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเฉพาะระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyze) กับไบโอรีเซฟเตอร์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพและ/หรือทางเคมี เช่น การผลิตไอออน, อิเล็กตรอน, แก๊สและความร้อน, เกิดการเปลี่ยนแปลงมวล หรือสมบัติของสีหรือแสง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ที่เหมาะสม จึงเป็นการลดขั้นตอนที่ยุ่งยากและสารเคมีที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ (โสภา กลิ่นจันทร์, 2001; Rasooly *et al*., 2009)

คาร์บอนนาโนทิวบ์ (carbon nanotubes) มีโครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอนชนิด sp^2 เชื่อมต่อกันในลักษณะเป็นแผ่น ซึ่งสามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยัง ¶-electron ได้ดี มีสมบัติคล้ายแท่งโลหะ สารกึ่งตัวนำ และตัวนำยิ่งยวด (Iijima, *et al*., 1993; Gong, *et al*., 2005; Popov, 2004) สามารถนำไฟฟ้าได้ดี มีพื้นที่ผิวสูงรวมทั้งทนต่อกรด-เบส และความร้อนสูงได้ดีมาก (Gong, *et al*., 2005) มีงานวิจัยที่นำคาร์บอนนาโนทิวบ์มาใช้ในการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ โดยช่วยเพิ่มสมบัติในการขนส่งอิเล็กตรอนและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์แลคเคสในการเร่งปฏิกิริยาการเกิดรีดักชันของน้ำเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นไบโอแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel cell) (Popov, 2004; Kaempgen, *et al*., 2008; Zheng, *et al*., 2008; Tan, *et al*., 2009)

ไคโตซาน (chitosan) เป็นโพลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยหน่วยของดี-กลูโคซามีน [poly (D-glucosamine] มีสมบัติละลายได้ดีในกรดอินทรีย์และมีประจุเป็นบวก มีความเหนียว ใส สารละลายไคโตซานสามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้งานด้านต่างๆ เช่น การเกษตร อาหาร สิ่งทอ การแพทย์ ยา เครื่องสำอาง ใช้ในการจัดการคุณภาพน้ำ (Rinaudo, 2006; Klotzbach, *et al*., 2006) และยังสามารถนำไคโตซานมาปรับปรุงให้มีสมบัติที่ดีขึ้นโดยการผสมกับวัสดุอื่น เช่น เอนไซม์ โดยที่หมู่เอมีนของไคโตซานจะสามารถจับกับหมู่แอลคิลของเอนไซม์ได้ (Rinaudo, 2006) ทำให้สามารถยึดจับเอนไซม์ได้ดี

แลคเคส (laccase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมไฮโดรเจนหรือออกซิเจน หรืออิเล็กตรอน จากสารประกอบหนึ่งไปยังสารประกอบอื่น มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลักและมีโลหะคอปเปอร์ 4 อะตอมอยู่ในโครงสร้าง โลหะคอปเปอร์ในโครงสร้างแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ type-1 (T1) มีคอปเปอร์ 1 อะตอม, type-2 (T2) คอปเปอร์ 1 อะตอม และ type-3 (T3 และ T3’) มีคอปเปอร์ 2 อะตอม (Zheng, *et al*., 2008; Solomon, *et al*., 1992) กระบวนการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนของเอนไซม์แลคเคสเริ่มขึ้นที่ตำแหน่ง T1 ซึ่งเป็นตำแหน่ง active site ที่มีการจับกับสารเป้าหมาย เกิดปฏิกิริยารีดักชันของคอปเปอร์ ที่ตำแหน่ง T1 และส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังตำแหน่ง T2/T3 และออกซิเจนเกิดปฏิกิริยารีดักชันไปเป็นน้ำ (Solomon, *et al*., 1992) ข้อดีของการใช้เอนไซม์แลคเคสเป็นตัวเร่งที่เหนือกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาอนินทรีย์ ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง (selectivity) และอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ไม่เป็นพิษ มีความสามารถในการละลายน้ำ สามารถทำซ้ำ (repeatability) ได้ ปฏิกิริยาเกิดได้ภายใต้สภาวะการทดลอง เช่น พีเอชของสารละลาย อุณหภูมิ และความดันที่ไม่รุนแรง และสามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ (Stolarczyk, *et al*., 2008; Fernández-Sánchez, *et al*., 2002)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน ที่มีสภาพไว (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจง (selectivity) และความเสถียร (stability) สูง โดยอาศัยการตรึงเอนไซม์แลคเคสในวัสดุเชิงประกอบของคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน (CNT-CS) ซึ่งเป็นเมทริกซ์ที่มีสมบัติที่ดี สามารถนำมาพัฒนาไบโอเซนเซอร์ได้ คาร์บอนนาโนทิวบ์ช่วยทำให้สามารถตรึงเอนไซม์แลคเคสได้ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น ส่วนไคโตซานซึ่งมีสมบัติที่เข้ากับสารชีวโมเลกุลได้ดี จึงเหมาะที่นำมาใช้งานควบคู่กับเอนไซม์แลคเคส ทำให้สามารถพัฒนาไบโอเซนเซอร์เป็นตัวตรวจวัดออกซิเจนและสามารถประยุกต์ใช้เป็นไบโอแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่นำมาใช้ในการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย เครื่องโพเทนชิโอสเตท รุ่น EA 161, e-Corder รุ่น 210 (บริษัท eDAQ, Australia) ระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า

คือขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode) ชนิดกลาสซีคาร์บอน (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร), ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) และขั้วไฟฟ้าช่วย (auxiliary electrode) ชนิดลวดแพลทินัม (Pt) (บริษัท CH Instruments, USA.) มิเตอร์วัดอัตราการไหลของแก๊ส รุ่น RK 1200 (flow meter, 0-100 มิลลิลิตรต่อนาที, บริษัท Kofloc; Japan)

2. สารเคมี

เอนไซม์แลคเคส (Laccase, EC 1.10.3.2) จาก Tramestes Versicolor 22.4U/mg (Sigma-Aldrich) คาร์บอนนาโนทิวบ์ (Carbon nanotubes; CNT, บริสุทธิ์ 95%), (NanoLab), ไดเมธิลฟอร์มานไมน์ (DMF), (Fluka) ไคโตซาน (Chitosan; CS, medium molecular weight, 75-85% deacetylated) (Sigma-Aldrich), โบวีนซีรัมอัลบูมีน (Bovine Serum Albumin; BSA, non acetylated), (Sigma-Aldrich), ซิเทรตบัฟเฟอร์ เตรียมจากซิติกแอซิดโมโนไฮเดรต และไดโซเดียมซิเทรต

3. การเตรียมสารเคมี

สารละลายแลคเคสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งเอนไซม์แลคเคส 4 มิลลิกรัม ใส่ในขวดขนาด 2 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย 0.1 โมลาร์ ซิเทรตบัพเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด นำสารละลายไปเขย่าด้วย vertex mixer ประมาณ 5 นาที

สารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 1% เตรียมโดยปิเปตโบวีนซีรัมอัลบูมีนมา 100 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำ

สารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยพัฒนาจากวิธีของ J. Wang และ M. Musameh (Wang & Musameh, 2004) โดยชั่งคาร์บอนนาโนทิวบ์ 3.0 มิลลิกรัม ใส่ในขวดขนาด 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายไดเมธิลฟอร์มานมายด์ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% เตรียมโดยพัฒนาจากวิธีของ T. Tangkuaram และคณะ (Tangkuaram, *et al*., 2007) โดยชั่งไคโตซาน 0.10 กรัม ใส่ในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ปิเปตกรดอะซิติกความเข้มข้น 2% ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวด นำไปกวนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สารละลายของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน เตรียมโดยปิเปตสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% มาอย่างละ 500 ไมโครลิตร ใส่ในขวดขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vertex mixer ประมาณ 5 นาที

<u>หมายเหตุ</u> น้ำที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารเคมีเป็นน้ำปราศจากไอออน

4. การเตรียมขั้วไฟฟ้า

ก่อนนำขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนไปดัดแปรเป็นขั้วไฟฟ้าชนิดต่างๆ จะนำขั้วไฟฟ้ามาทำความสะอาด โดยขัดผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าด้วยผงอะลูมินากับผ้าสักหลาด โดยใช้ผงอะลูมินาขนาด 1.0, 0.3 และ 0.05 ไมครอน ตามลำดับ จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำไป sonicate ในน้ำเป็นเวลา 2 นาที แล้วเป่าให้แห้ง

4.1 ขั้วไฟฟ้า GC/laccase

หยดสารละลายเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยเอนไซม์แลคเคส (GC/laccase)

4.2 ขั้วไฟฟ้า GC/CNT

หยดสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ขั้วไฟฟ้า ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT)

4.3 ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS

หยดสารละลายของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน บนขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจะได้ขั้วไฟฟ้า ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน (GC/CNT-CS)

5. การตรึงเอนไซม์แลคเคสและสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูลมีนบนขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS

นำขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS ที่ได้จากการเตรียมในข้อ 4.3 มาตรึง เอนไซม์โดยการหยดเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และหยดสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 1% ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน เอนไซม์แลคเคส และโบวีนซีรัมอัลบูมีน (GC/CNT-CS/laccase/BSA)

6. การตรวจวัดปริมาณออกซิเจน

ศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนด้วยเทคนิคไซคลิกโวแทมเมทรี (cyclic voltemmetry) โดยใช้เครื่องโพเทนชิโอสเตทและระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า ใช้ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC) หรือขั้วไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมา เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน โดยการให้

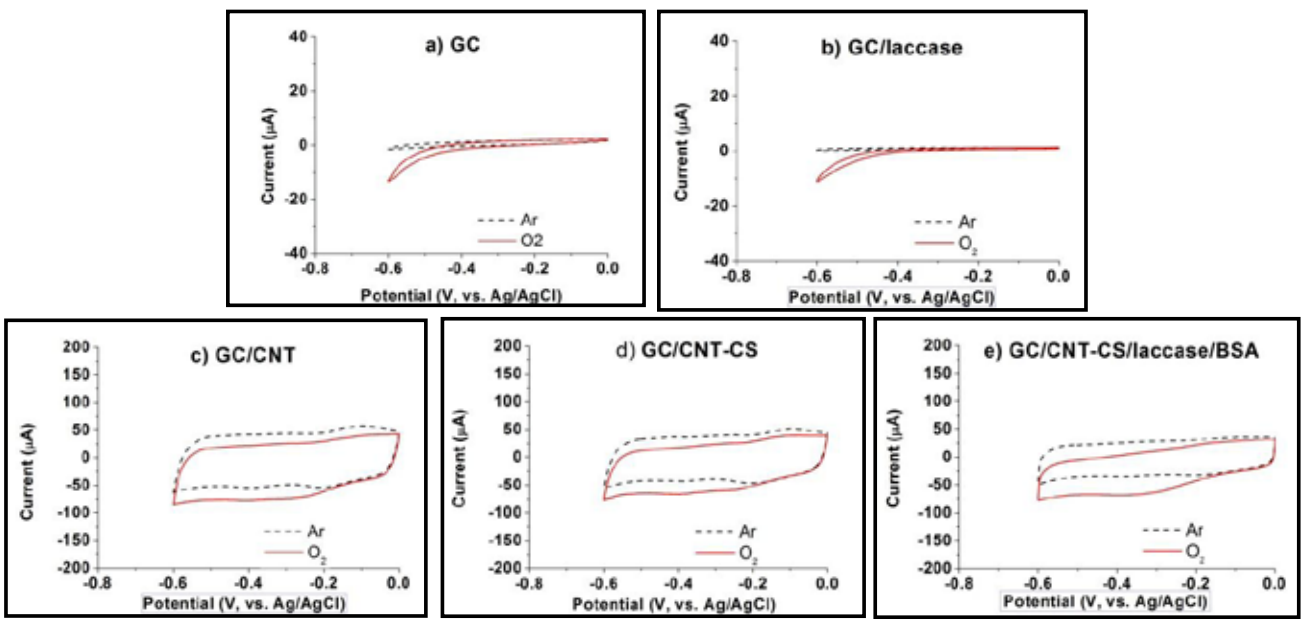
ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0.0 ถึง -0.6 โวลต์ เทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ให้แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน ในสารละลายของซิเทรตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

การทดลองในสภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจน จะนำสารละลายซิเทรตบัพเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่อิ่มตัวด้วยแก๊สอาร์กอน (Ar) มาทำการวัดด้วยเทคนิคไซคลิกโวแทมเมทรีภายใต้บรรยากาศแก๊สอาร์กอน ส่วนในสภาวะที่มีออกซิเจนจะนำสารละลายซิเทรตบัพเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิตร ที่อิ่มตัวด้วยแก๊สออกซิเจน มาทำการทดลองภายใต้อัตราการไหลของออกซิเจน 40 มิลลิลิตรต่อนาที

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การศึกษาหาองค์ประกอบที่เหมาะสมของไบโอเซนเซอร์

การศึกษาหาองค์ประกอบที่เหมาะสมของไบโอเซนเซอร์โดยใช้แลคเคสในการทำให้ dioxygen (O_2) เกิด electro-enzymatic reduction เป็นน้ำ (H_2O) จะศึกษาการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้าทั้ง 5 ชนิด (a-e) ได้แก่ a: ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC), b: ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคส (GC/laccase), c: ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT), d: ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน (GC/CNT-CS) และ e: ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน เอนไซม์แลคเคสและโบวีนซีรัมอัลบูมีน (GC/CNT-CS/laccase/ BSA) ผลการทดลองดังภาพที่ 1



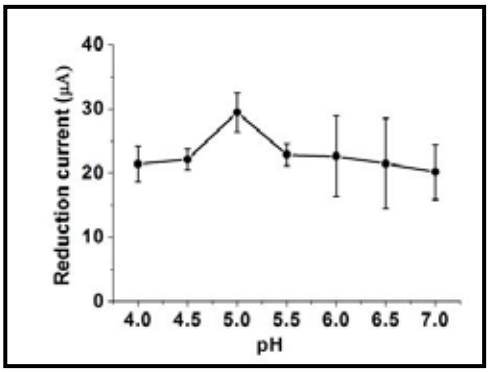
ภาพที่ 1 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ (a) ขั้วไฟฟ้า GC ในสภาวะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจน (เส้นประ) และในสภาวะที่มีออกซิเจน (เส้นทึบ), (b) ขั้วไฟฟ้า GC/laccase, (c) ขั้วไฟฟ้า GC/CNT, (d) ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS และ (e) ขั้วไฟฟ้าGC/CNT-CS/laccase/BSA ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ซิเทรตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 (อัตราการไหลของออกซิเจนเหนือสารละลายเป็น 40 มิลลิลิตรต่อนาที)

พบว่าปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าสูงกว่า -0.6 V เมื่อใช้ GC และ GC/laccase เป็นขั้วไฟฟ้า แต่เมื่อใช้ขั้ว GC/CNT, ขั้วGC/CNT-CS และขั้ว GC/CNT-CS/laccase/BSA เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งานปฏิกิริยารีดักชันเกิดที่ศักย์ไฟฟ้าประมาณ -0.3 ถึง -0.4 V จากผลการทดลอง (ภาพที่ 1 c, d และ e) พบว่าค่ากระแสพื้น (background current; B) ของขั้วไฟฟ้า GC/CNT สูงที่สุดตามด้วย GC/CNT-CS และขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ตามลำดับ เมื่อพิจารณาที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA พบว่าให้สัญญาณ (Signal; S) จากค่ากระแสรีดักชันของออกซิเจนเมื่อลบด้วยค่ากระแสพื้น (S/B) ที่มีค่ามากที่สุด แสดงว่ามีสภาพไวสูงที่สุด และให้ค่าศักย์ที่ยอดพีค (Ep) ที่ศักย์ไฟฟ้า -0.35 V แสดงว่าปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน

ถูกเร่งด้วยประสิทธิภาพสูงที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากสมบัติของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่มีพื้นที่ผิวสูงและนำไฟฟ้าได้ดี และสมบัติที่เข้ากันได้ดีกับสารชีวภาพของไคโตซานจึงทำให้สามารถตรึงเอนไซม์ได้ดีและส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ อีกทั้งยังสนับสนุนด้วยโบวีนซีรัมอัลบูมีนที่ช่วยให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานมากขึ้น ส่งผลให้ค่ากระแสมีค่ามากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ที่เตรียมได้มีลักษณะทางกายภาพที่เสถียร คือเมื่อล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนทำการวัดจะไม่ทำให้เกิดการหลุดร่อนของสารละลายที่นำมาดัดแปรที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า

การศึกษาหาพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกื้อหนุนที่เหมาะสม

ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA จะถูกนำไปตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนในสารละลายซิเทรตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ ผลการทดลองดังภาพที่ 2 ค่ากระแสรีดักชันในรูปเป็นค่าเฉลี่ยจาก ขั้วไฟฟ้าที่เตรียมขึ้น 3 ขั้วไฟฟ้า ส่วนแถบความคลาดเคลื่อน (error bar) แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวัด



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน กับค่าพีเอช ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ 0.1 โมลาร์ ซิเทรตบัพเฟอร์

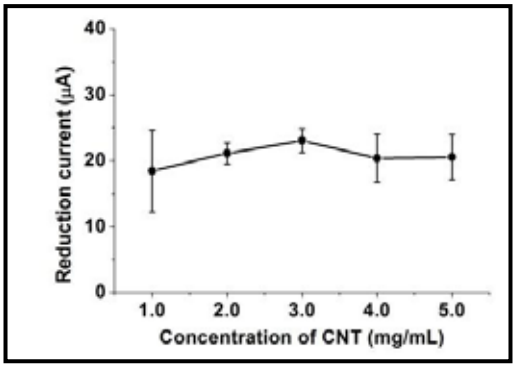
พบว่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ที่พีเอช 5.0 ให้ค่ากระแสที่สูงที่สุด แสดงว่าเอนไซม์แลคเคสทำงานได้ดีในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ พีเอช 5.0 สอดคล้องกับผลการทดลองของ B. Haghighi (Haghighi, *et al*., 2003) และ M. Portaccio (Portaccio, *et al*., 2006) ซึ่งใช้เอนไซม์แลคเคสในการพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับวัดสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และพบว่าเอนไซม์แลคเคสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 5.0

เมื่อเพิ่มพีเอชของสารละลายให้สูงขึ้นค่ากระแสที่ได้ลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ S. K. Lee และคณะ และ R. Santucci และคณะ (Lee *et al*., 2002; Santucci *et al*., 1998) ซึ่งพบว่าในขั้นตอนการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนไปเป็นน้ำของแลคเคส การเกิดรีดักชันของออกซิเจนที่ตำแหน่ง T2 และ T3 ไฮดรอกซิลและไซยาไนด์สามารถยับยั้งการเข้าไปจับของออกซิเจนกับคอปเปอร์ที่ตำแหน่ง T2 และ T3 ของเอนไซม์แลคเคสได้ ทำให้แลคเคสสูญเสียสมบัติการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ค่ากระแสจึงลดลงเมื่อพีเอชของสารละลายเพิ่มขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกพีเอช 5.0 เป็นพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกื้อหนุนที่เหมาะสม

การศึกษาปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่เหมาะสมในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานคอมโพสิต

ในการศึกษาหาปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานที่เหมาะสม จะเตรียมไบโอเซนเซอร์ GC/CNT-CS/laccase/BSA โดยใช้สารละลายของคาร์บอนนาโนทิวบ์ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1.0% ผลของปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ต่อการตรวจวัดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนแสดงดังภาพที่ 3



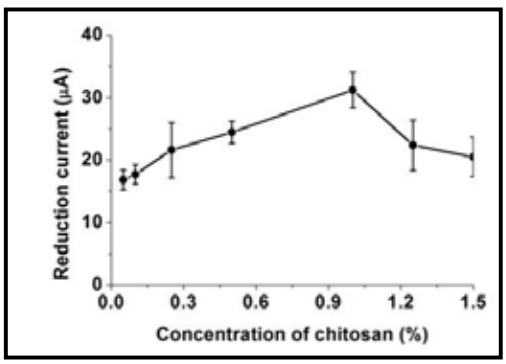
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนกับความเข้มข้นของคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่ใช้ในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน

จากผลการทดลอง เมื่อปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์เพิ่มขึ้นจาก 1-3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่ากระแสที่ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากสมบัติของคาร์บอนนาโนทิวบ์ซึ่งเป็นสารที่มีพื้นที่ผิวสูงและมีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี เมื่อมีปริมาณของ

คาร์บอนนาโนทิวบ์มากขึ้นจึงทำให้สามารถตรึงเอนไซม์ได้มากขึ้น ค่ากระแสที่ได้จึงมีค่าเพิ่มสูงขึ้น แต่ถ้าปริมาณของคาร์บอนนาโนทิวบ์มีมากเกินไปกลับทำให้ค่ากระแสลดลง ซึ่งเป็นผลจากการนำไฟฟ้าได้ดีของคาร์บอนนาโนทิวบ์ ทำให้ค่ากระแสพื้น (background; B) มีขนาดใหญ่ขึ้น สัญญาณ (Signal; S) จากค่ากระแสรีดักชันของออกซิเจนเมื่อลบด้วยค่ากระแสพื้น (S/B) จึงมีค่าลดลง ดังนั้นจึงเลือกปริมาณคาร์บอนนาโนทิวบ์ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ค่ากระแสที่สูงที่สุดใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาปริมาณไคโตซานที่เหมาะสมในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานคอมโพสิต

ในการศึกษาหาปริมาณของไคโตซานที่เหมาะสมในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน ใช้ปริมาณของไคโตซานเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.25 และ 1.5% ในคาร์บอนนาโนทิวบ์ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4

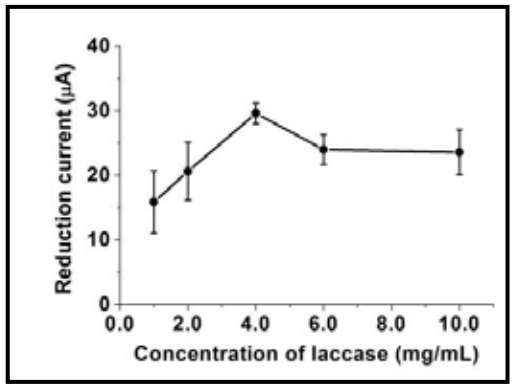


ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน กับความเข้มข้นของไคโตซานในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน

พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มมากขึ้นค่ากระแสที่ได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากสมบัติที่เข้ากันได้ดีของไคโตซานกับสารชีวภาพ จึงช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แลคเคส ค่ากระแสที่ได้จึงเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นมากกว่า 1.0% พบว่าค่ากระแสเริ่มลดลง เนื่องจากถ้ามีปริมาณไคโตซานมากขึ้นจะมีความหนืดเพิ่มขึ้นและมีความสามารถในการนำไฟฟ้าลดลง ปริมาณไคโตซานที่มากขึ้นกว่า 1.0% ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นจึงเลือก 1.0% ไคโตซานซึ่งให้ค่ากระแสที่สูงที่สุดเป็นค่าที่เหมาะสม

การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์แลคเคส

เมื่อได้อัตราส่วนของเมทริกซ์วัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์แลคเคส ความเข้มข้นที่ศึกษาคือ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน กับความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ใช้ในการเตรียมขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA

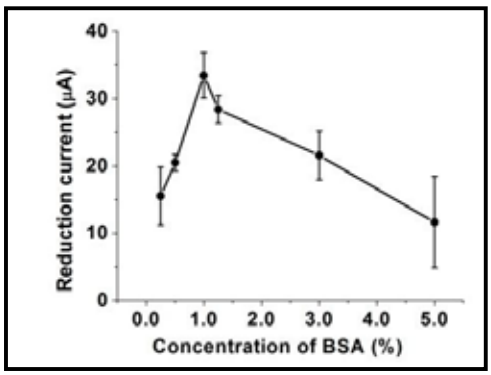
จากผลการทดลองในภาพที่ 5 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสจาก 1-4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ค่ากระแสรีดักชันของออกซิเจนที่สูงขึ้น เนื่องจากปริมาณเอนไซม์สูงขึ้นช่วยเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น จึงเพิ่มความสามารถในการตรวจวัดสูงขึ้น ค่ากระแสที่ได้จึงสูงขึ้น โดยปริมาณเอนไซม์ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่ากระแสที่มากที่สุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์สูงขึ้นมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่ากระแสได้ไม่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากพื้นที่ผิวในการตรึงเอนไซม์แลคเคสในเมทริกซ์วัสดุเชิงประกอบมีปริมาณจำกัด ดังนั้นปริมาณที่เติมมากเกินพอของเอนไซม์แลคจึงไม่มีผลต่อค่ากระแส หรืออาจเกิดเนื่องมาจากปริมาณเอนไซม์ที่เติมเพิ่มมากเกินพอ ส่งผลให้เกิดการต้านทานการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาผลของปริมาณสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีน

การศึกษาปริมาณสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีน จะใช้ความเข้มข้นของสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีน 0.25, 0.5, 1.0, 1.25, 3 และ 5% ผลของปริมาณสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีนต่อขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ต่อค่ากระแสรีดักชันของออกซิเจนแสดงดังภาพที่ 6

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีนจาก 0.25 จนถึง 1.0% จะได้ค่ากระแสที่เพิ่มขึ้น (เพิ่มขึ้นจากเดิมถึงประมาณ 120%) โดยค่าความเข้มข้นที่ 1.0% ให้ค่ากระแสสูงที่สุด

แสดงว่าสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีนมีส่วนช่วยในการทำงานของเอนไซม์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ J. Kulys (Kulys *et al*. 2002) ซึ่งใช้แลคเคสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ methyl syringates และพบว่าโบวีนซีรัมอัลบูมีนสามารถป้องกันการเกิด inactivate ของเอนไซม์แลคเคส



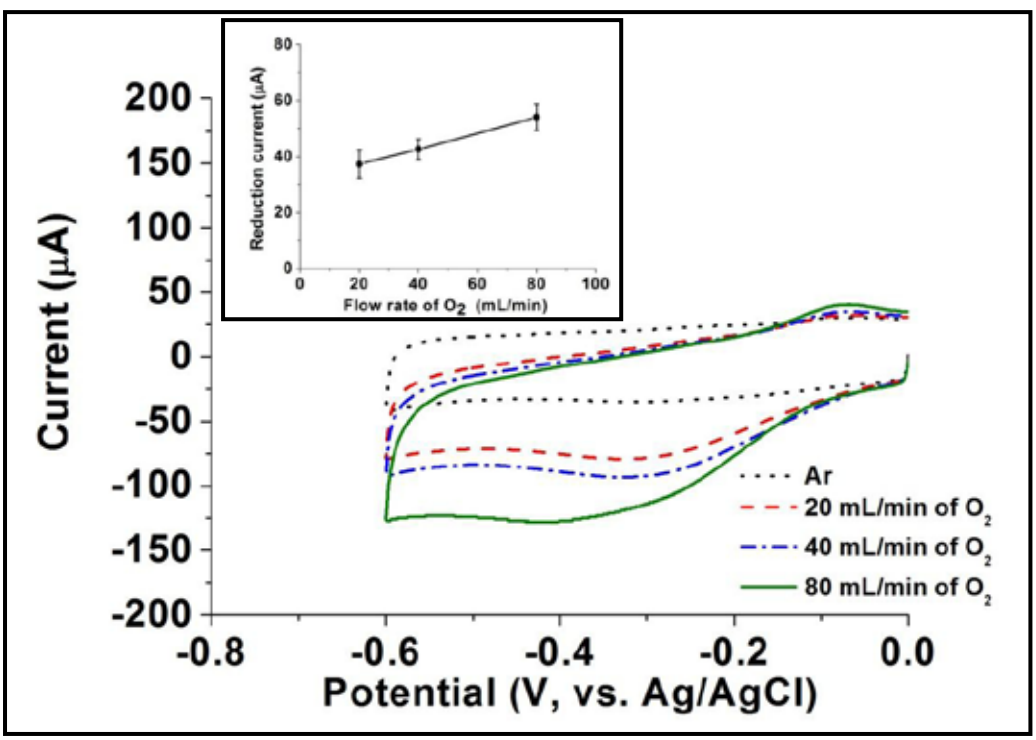
ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนกับความเข้มข้นของสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีนที่ใช้ในการเตรียมไบโอเซนเซอร์

จากการทดลองเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากกว่า 1.0% ค่ากระแสที่ได้กลับลดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากปริมาณของโบวีนซีรัมอัลบูมีนที่มีมากเกินไปทำให้เกิดการขัดขวางการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ ค่ากระแสที่ได้จึงลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้ 1% โบวีนซีรัมอัลบูมีนในการดัดแปรขั้วไฟฟ้า

การศึกษาสัญญาณการตอบสนองของขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ต่อปริมาณแก๊สออกซิเจน

จากผลการทดลองในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าองค์ประกอบต่างๆ ที่เหมาะสมในการเตรียมขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA คือใช้สารละลายของคาร์บอนนาโนทิวป์ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1.0% นำมาหยดบนขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาตรึงเอนไซม์โดยการหยดเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และหยดสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีนความเข้มข้น 1% ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จะได้ขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA

เมื่อนำขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA มาศึกษาการตอบสนองต่อปริมาณแก๊สออกซิเจน โดยในการทดลองจะควบคุมอัตราการไหลของออกซิเจนเหนือระดับสารละลายที่ 20, 40 และ 80 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนกับอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจน

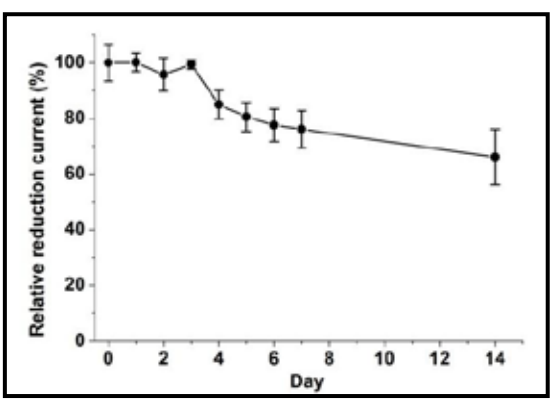
ค่ากระแสรีดักชันของออกซิเจนจะสัมพันธ์กับอัตราการไหลของแก๊สออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นแบบเป็นเส้นตรง (r^2 = 0.9996, ค่าความชันของสมการเส้นตรงเป็น 0.279) ที่ช่วงของอัตราการไหลที่ทำการทดลอง 20- 80 มิลลิลิตรต่อนาที ค่ากระแสที่ได้จากการวัดซ้ำๆ มีความเที่ยง (precision) ดีมากคือให้ค่า %RSD เท่ากับ 3.89 (n = 5)

ผลการทดลองจากเทคนิคไซคลิกโวแทมเมทรีแสดงให้เห็นว่าขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ที่พัฒนาขึ้นตอบสนองต่อปริมาณออกซิเจน สามารถใช้เป็นตัวตรวจวัดออกซิเจนและอาจจะนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดในการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนในระบบที่มีการไหลด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรี เพื่อพัฒนาให้เป็นระบบวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่สะดวก รวดเร็ว และใช้สารปริมาณน้อย ต่อไป

ศึกษาความเสถียรของไบโอเซนเซอร์

ศึกษาความเสถียรของขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA โดยการเตรียมขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว และนำมาวัดค่ากระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจน หลังจากเตรียมขั้วไฟฟ้าไว้เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 14 วัน

จากภาพที่ 8 พบว่าขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA มีความเสถียร โดยค่ากระแสรีดักชันของออกซิเจนที่ได้จากการวัดเมื่อเตรียมได้ใหม่ๆ หลังจากเตรียมไบโอเซนเซอร์ไว้ 1, 2 และ 3 วัน มีค่าที่ค่อนข้างคงที่และใกล้เคียงกับค่าเริ่มต้น (~100%) และเริ่มลดลงเมื่อวัดในวันที่ 4 โดยวัดค่ากระแสได้ประมาณ 85% และเมื่อทิ้งไว้ 7 วันค่ากระแสลดลงเหลือประมาณ 76% และลดลงเหลือประมาณ 70% เมื่อทิ้งไว้ 14 วัน



ภาพที่ 8 ความเสถียรของขั้วไฟฟ้า GC/CNT-CS/laccase/BSA ที่ระยะเวลาต่างๆ ในการเก็บรักษา (เก็บที่อุณหภูมิ 4°C)

เมื่อเปรียบเทียบกับความเสถียรของขั้วไฟฟ้า จากงานวิจัยของ H. L. Pang (Pang, *et al*., 2010) ซึ่งศึกษาขั้วไฟฟ้า 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 กลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์และเอนไซม์แลคเคส (GC/CNT/laccase) และขั้วไฟฟ้าชนิดที่ 2 ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็น 1-aminopyrene (CNT-AP) และนำมาตรึงเอนไซม์แลคเคสโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวช่วย (GC/CNT-AP/laccase) ซึ่งพบว่าเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน ค่ากระแสที่ได้จากการวัดขั้วไฟฟ้าชนิดที่ 1 จะลดลงเหลือประมาณ 69.3% และในขั้วไฟฟ้าชนิดที่ 2 เหลือประมาณ 85.3% ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ซึ่งตรึงเอนไซม์ในเมทริกของคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานที่มีโบวีนซีรัมอัลบูมีนจึงมีความเสถียรดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงเอนไซม์ในคาร์บอนนาโนทิวบ์ (ขั้วไฟฟ้าชนิดที่ 1 GC/CNT/laccase) และมีความเสถียรน้อยกว่าขั้วไฟฟ้าชนิดที่ 2 (GC/CNT-AP/laccase) เล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบวิธีการในการเตรียมขั้วไฟฟ้าซึ่งในขั้วไฟฟ้าชนิดที่ 2 ต้องมีขั้นตอนในการเตรียมคาร์บอนนาโนทิวบ์ให้มีหมู่ฟังก์ชันเป็น 1-aminopyrene (CNT-AP) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสะดวกและง่ายในการเตรียมมากกว่า

ขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นมีความเสถียรดี สามารถใช้เป็นตัวตรวจวัดออกซิเจน และอาจจะนำมาประยุกต์ใช้เป็นไบโอแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้

สรุปผลการวิจัย

ไบโอเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นโดยการตรึงเอนไซม์แลคเคสไว้ในเมทริกซ์ของวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซาน ทำให้ได้ไบโอเซนเซอร์ที่มีสภาพไว มีความจำเพาะเจาะจง และมีความเสถียรที่ดี เนื่องจากวัสดุเชิงประกอบคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานมีความสามารถเข้ากับสารชีวโมเลกุล (biocompatibility) สามารถช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการตรึงเอนไซม์ให้สูงขึ้นและนำไฟฟ้าได้ดี เอนไซม์แลคเคสถูกตรึงที่พื้นผิวของขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนบนวัสดุเชิงประกอบของคาร์บอนนาโนทิวบ์-ไคโตซานและสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีน ทำให้สามารถใช้เป็นตัวตรวจวัดออกซิเจน และอาจจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นไบโอแคโทดในเซลล์เชื้อเพลิงชีวภาพได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ, สำนักงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำหรับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยและทุนการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

โสภา กลิ่นจันทร์. (2001) ไบโอเซนเซอร์กับการประยุกต์ใช้. *The Journal of KMITNB., 11*, 62-64.

Fernández-Sánchez, C., Tzanov T., Gübitz, G. M., & Paulo, A. C. (2002). Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions. *Bioelectrochemistry, 58*, 149-156.

Gong, K., Yan, Y., Zhang, M., Su, L., Xiong, S., & Mao, L. (2005). Electrochemistry and electroanalytical applications of carbon nanotubes: A review. *Analytical Sciences, 21*, 1383-1393.

Haghighi, B., Gorton, L., Ruzgas, T. & Jonsson, L.J. (2003). Characterization of graphite electrodes modified with laccase from Tamestes vesicolor and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta, 487*, 3-14.

Iijima, S., & Ichihasi, T. (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature, 363*, 603-605.

Kaempgen, M., Lebert, M., Roth, S., Soehn, M., & Nicoloso, N. (2008). Fuel cells based on multifunctional carbon nanotube networks. *Journal of Power Sources, 180*, 755-759.

Klotzbach, T., Watt, M., Ansari, Y., & Minteer, S. D. (2006). Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization. *Journal of Membrane Science, 282*, 276-283.

Kulys, J., Krikstopaitis, K., Ziemys, Arturas., & Schneider, P. (2002). Laccase-catalyzed oxidation of syringates in presence of albumins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatics, 18*, 99-108.

Lee, S. K., George, S. D., Antholine, W. E., Hedman, B., Hodgson, K. O., & Solomon, E. I. (2002). Nature of the intermediate formed in the reduction of O_2 to H_2O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *Journal of American Chemical Society, 124*, 6180-6193.

Pang, H. L., Liu, J., Hu, D., Zhang, X.H., & Chen J.H. (2010). Immobilization of laccase onto 1-aminopyrene functionalized carbon nanotubes and their electrocatalytic activity for oxygen reduction. *Electrochimica Acta, 55*, 6611-6616.

Popov, V.N., (2004). Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports, 43*, 61-102.

Portaccio, M., Di Martino, S., Durante, D., De Luca, P., Lepore, M., Bencivenga, U., Rossi, S., De Maio, A., & Mita, D.G. (2006). Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 41*, 97-102.

Rasooly, A. & Herold, K. E. (Eds) (2009). Biosensors and biodetection methods and protocols, (pp.v-ix), New York, Humana Press.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science, 31*, 603-632.

Santucci, R., Ferri, T., Morpurgo, L., Savini, I., & Avigliano, L. (1998). Unmediated heterogenous electron transfer reaction of ascorbate oxidase and laccase at gold electrode. *Biochemistry Journal, 332*, 611-615.

Solomon, E. I., Baldwin, M. J., & Lowery, M. D. (1992). Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity, *Chemical Reviews, 92*, 521-542.

Stolarczyk, K., Nazaruk, E., Rogalski, J., & Bilexicz, R. (2008). Nanostructured carbon electrodes for laccase-catalyzed oxygen reduction without added mediators. *Electrochimica Acta, 53*, 3983-3990.

Tan, Y., Deng, W., Ge, B., Xie, Q., Huang, J., & Yao, S. (2009). Biofuel cell and phenolic biosensor based on acid-resistant laccase-glutaraldehyde functionalized chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite film. *Biosensors and Bioelectronics, 24*, 2225-2231.

Tangkuaram, T., Wang, J., Rodriguez, M. C., Laocharoensuk, R., & Veerasai, W. (2007). Highly stable amplified low-potential electrocatalytic detection of NAD^+ at azure-chitosan modified carbon electrodes. *Sensors and Actuators B, 30*, 277-281.

Wang, J. & Musameh, M. (2004). Electrochemical detection of trace insulin at carbon-nanotube-modified-electrodes. *Analytica Chimica Acta, 511*, 33–36.

Zheng, W., Zhou, H.M., Zheng, Y.F., & Wang, N. (2008). A comparative study on electrochemistry of laccase at two kinds of carbon nanotubes and its application for biofuel cell. *Chemical Physics Letters, 457*, 381-385.