

การตรึงเอนไซม์ไฮโดรเลสบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสต์
เพื่อวิเคราะห์เมทิลพาราไทออน

IMMOBILIZED HYDROLASE ENZYME ON CARBON PASTE ELECTRODE
FOR ANALYSIS OF METHYL PARATHION

ศ.ดร. รุดี
กนกวรรณ รุดีศิริศักดิ์
KANOKWAN RUDISIRISAK

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดำเนินการตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-9708-68-7

การตรึงเอนไซม์ไฮโดรเลสบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสต์
เพื่อวิเคราะห์เมทิลพาราไทออน

IMMOBILIZED HYDROLASE ENZYME ON CARBON PASTE ELECTRODE
FOR ANALYSIS OF METHYL PARATHION



กนกวรรณ ฤดีสิริศักดิ์

KANOKWAN RUDISIRISAK

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2547

ISBN 974-9708-68-7

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 51640
วัน,เดือน,ปี 26 ก.ค. 2547

| |
|---------|
| .b..... |
| .i..... |

IMMOBILIZED HYDROLASE ENZYME ON CARBON PASTE ELECTRODE
FOR ANALYSIS OF METHYL PARATHION

KANOKWAN RUDISIRISAK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2004

ISBN 974-9708-68-7

COPYRIGHT 2004

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT' S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรึงเอนไซม์ไฮโดรเลสบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนเพสต์เพื่อวิเคราะห์เมทิลพาราไทออน
IMMOBILIZED HYDROLASE ENZYME ON CARBON PASTE
ELECTRODE FOR ANALYSIS OF METHYL PARATHION

ชื่อนักศึกษา นางสาวกนกวรรณ ฤดีศิริศักดิ์

รหัสประจำตัว 43065505

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เคมี (เคมีวิเคราะห์)

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สุวรรณ ไชยสิทธิ์

| คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ | | ลายมือชื่อ |
|--------------------------|-----------------|------------------------|
| ดร.วิบูลย์ | ประดิษฐ์เวียงคำ | อัญชลี ประดิษฐ์เวียงคำ |
| ผศ.ดร.สุวรรณ | ไชยสิทธิ์ | ผศ.ดร.สุวรรณ ไชยสิทธิ์ |
| รศ.อรุณี | คงศักดิ์ไพศาล | รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล |
| ดร.นิตยา | โจ้ววัฒนา | ดร.นิตยา โจ้ววัฒนา |

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 4 พฤษภาคม 2547 เวลา 9.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารัตนวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 6 ห้อง 611

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ดร.จารูวัตร เจริญสุข)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....26.....เดือน.....พฤษภาคม.....พ.ศ.....2547.....

| | |
|-----------------------------|--|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การตรึงไนโตรเจนของไซมูไฮโครเลสบนข้าวคาร์บอนเพสต์ เพื่อวิเคราะห์เมทิลพาราไทออน |
| นักศึกษา | นางสาวกนกวรรณ ฤทธิศิริศักดิ์ |
| รหัสประจำตัว | 43065505 |
| ภาควิชา | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| สาขาวิชา | เคมี (เคมีวิเคราะห์) |
| พ.ศ. | 2547 |
| อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ | ผศ.ดร.สุวรรณ ไชยสิทธิ์ |

บทคัดย่อ

เมทิลพาราไทออน เป็นสารพิษอันตรายที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และถูกย่อยเป็นพาราไนโตรฟินอลด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียได้ งานวิจัยนี้จึงออกแบบวิธีการวิเคราะห์เมทิลพาราไทออนโดยการตรึงเอนไซม์ไซมูไฮโครเลสที่สกัดจาก *Burkholderia cepacia* บนข้าวคาร์บอนเพสต์แล้ววัดผลิตภัณฑ์พาราไนโตรฟินอลด้วยวิธีแอมเพอโรเมทรี พบว่าสถานะที่เหมาะสมคือการวิเคราะห์ด้วยระบบการไหลต่อเนื่องผ่านข้าวคาร์บอนเพสต์ ที่มีอัตราส่วนผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ 1 : 1 ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็น 0.95 โวลต์ เมื่อเทียบกับขั้วอ้างอิง ซิลเวอร์ - ซิลเวอร์คลอไรด์ อัตราการไหลของบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0 เป็น 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร พบว่าเมื่อตรึงเอนไซม์ไซมูไฮโครเลสที่มีแอกทิวิตี 11.5 ไมโครโมลต่อนาที บนข้าวดังกล่าวสามารถวิเคราะห์เมทิลพาราไทออนที่ความเข้มข้นต่ำสุดได้ 2.58 พีพีเอ็ม ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 2.58 - 80 พีพีเอ็ม ($r^2 = 0.989$) และแอกทิวิตีของข้าวเอนไซม์ตรึงลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจวัดเมทิลพาราไทออนความเข้มข้น 60 พีพีเอ็ม 3 ชั่วโมง 10 ครั้งต่อวัน เช่นเดียวกับการตรวจวัดเมทิลพาราไทออน ความเข้มข้นดังกล่าว 1 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 5 วันต่อเนื่องกัน

| | |
|----------------|---|
| Thesis Title | Immobilized Hydrolase Enzyme on Carbon Paste Electrode for Analysis of Methyl Parathion |
| Student | Miss Kanokwan Rudisirisak |
| Student ID | 43065505 |
| Department | Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang |
| Degree | Master of Science |
| Programme | Chemistry (Analytical Chemistry) |
| Year | 2004 |
| Thesis Advisor | Asst. Prof. Dr. Suwan Chaiyasith |

ABSTRACT

Methyl parathion is a toxic substance that had contaminated in the environment. Methyl parathion is decomposed to p-nitrophenol by hydrolase enzyme extracted from bacteria. This thesis focused on the analysis of methyl parathion by using hydrolase enzyme, extracted from *Burkholderia cepacia*, that was immobilized on carbon paste electrode and determined the hydrolyse methyl parathion product, p-nitrophenol, by amperometry. The suitable conditions were flow system, carbon paste electrode composed with graphite powder and parafin oil by the ratio of 1:1, an oxidation peak of p-nitrophenol was at 0.95 V vs Ag/AgCl, while a flowrate of 0.1 M 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.0 and sample loop were 0.2 mL/min and 20 μ L, respectively. It was found that immobilized hydrolase, with the activity of 11.5 μ mol/min, on prepared carbon paste electrode were used to analyse for methyl parathion with a quantitative detection limit 2.58 ppm and linear range from 2.58 to 80 ppm ($r^2 = 0.989$). Activity of immobilized enzyme electrode was decreased 50 % after triple analysis of 60 ppm methyl parathion for 10 times/day, or analysis once a day for 5 days continually.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุวรรณ ไชยสิทธิ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณ รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ดร. วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ ดร.นิตยา ใจวัธมา คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่ายิ่งเพื่อเป็นกรรมการสอบ พร้อมกับให้ข้อเสนอแนะ ตลอดจนช่วยตรวจรายละเอียดต่างๆในวิทยานิพนธ์นี้ให้เป็นไปอย่างถูกต้อง

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง ที่ให้ความรู้และคำอธิบายต่างๆ ในเรื่องจุลชีววิทยา การเลี้ยงจุลินทรีย์และการสกัดเอนไซม์และเป็นกำลังใจให้ทำงานวิจัยต่อไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จโรรัตน์ ดวงเดือน รศ. ดร. ชัยยุทธ ช่างสาร อ.จตุพร เผ่าพงษ์ไทย รวมทั้งอาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านใน สถาบันวิจัยเคมี และคณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือ คำปรึกษา และให้กำลังใจเป็นอย่างดีในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพงศ์ภัทร์ คุณเอกชัย บริษัทไบเออร์ประเทศไทยจำกัด และคุณเสาวภา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีและเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้

ขอขอบคุณ คุณชยาภรณ์ สืบเสาะ คุณวันเพ็ญ ประสิทธิ์วงษ์ รวมทั้งเพื่อนๆ รุ่นพี่ และ รุ่นน้อง นักศึกษาปริญญาโทเคมีและเคมีสิ่งแวดล้อมทุกคนที่ให้อาสาใจและความช่วยเหลือต่างๆ เพื่อให้การทำวิทยานิพนธ์นี้ราบรื่นยิ่งขึ้น

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ ดร.นิตยา ใจวัธมา คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว และญาติพี่น้องทุกคน ที่เป็นกำลังใจ ช่วยเหลือ สนับสนุนในทุกๆ ด้านตลอดเวลาในการเรียนปริญญาโท ณ สถาบันแห่งนี้

คุณค่าและประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

กนกวรรณ ฤดีสิริศักดิ์

สารบัญ

| | หน้า |
|--|----------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | I |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | II |
| กิตติกรรมประกาศ..... | III |
| สารบัญ..... | IV |
| สารบัญตาราง..... | IX |
| สารบัญรูป..... | XI |
| สัญลักษณ์และคำย่อ..... | XIV |
| บทที่ 1. บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์..... | 2 |
| 1.3 ขอบเขตการวิจัย..... | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 3 |
| บทที่ 2. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 4 |
| 2.1 สมบัติของเมทิล พาราไทออน (Methyl Parathion)..... | 4 |
| 2.1.1 ชื่อ สมบัติทางกายภาพ และทางเคมี..... | 4 |
| 2.1.2 ความเป็นพิษของเมทิลพาราไทออน (Toxicity of Methyl Parathion)..... | 5 |
| 2.1.3 การย่อยสลาย เมทิลพาราไทออนโดยจุลินทรีย์..... | 6 |
| 2.1.4 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลาย เมทิลพาราไทออน..... | 8 |
| 2.2 สมบัติของพาราไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol)..... | 8 |
| 2.2.1 ชื่อ สมบัติทางกายภาพและทางเคมี..... | 8 |
| 2.2.2 ความเป็นพิษของพาราไนโตรฟีนอล (Toxicity of p-nitrophenol)..... | 9 |
| 2.2.3 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าย่อยสลาย พาราไนโตรฟีนอล..... | 9 |
| 2.3 การแยกเอนไซม์จากจุลินทรีย์..... | 10 |
| 2.3.1 แหล่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์..... | 11 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|-----------|
| 2.3.2 การทำให้เซลล์แตก (Cell disruption technique)..... | 12 |
| 2.3.3 การหาปริมาณโปรตีน..... | 14 |
| 2.3.4 แอคทีวิตีของเอนไซม์..... | 14 |
| 2.3.5 การตรึงเอนไซม์..... | 14 |
| 2.4 สมบัติของ ออร์แกโนฟอสฟอรัส ไฮโดรเลส (Organophosphorus hydrolase)..... | 18 |
| 2.5 ลักษณะของ <i>Burkholderia cepacia</i> | 18 |
| 2.6 ไบโอสเซนเซอร์ (Biosensors)..... | 21 |
| 2.7 แอมเพอโรเมทรี (Amperometry)..... | 22 |
| 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 23 |
| บทที่ 3. วิธีดำเนินการวิจัย..... | 30 |
| 3.1 อุปกรณ์..... | 30 |
| 3.2 สารเคมี..... | 31 |
| 3.3 วิธีการทดลอง..... | 32 |
| 3.3.1 ทดสอบการย่อยสลาย MP ของเชื้อ <i>Burkholderia cepacia</i> | 32 |
| 3.3.2 วัดการเจริญเติบโตของเซลล์ <i>Burkholderia cepacia</i> ในอาหาร LB..... | 32 |
| 3.3.3 การแยกเอนไซม์..... | 32 |
| 3.3.4 หาพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดแอคทีวิตีของเอนไซม์..... | 33 |
| 3.3.5 หาความเสถียรภาพของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 °C..... | 33 |
| 3.3.6 การจัดอุปกรณ์และสร้างขั้วไฟฟ้าในระบบแบตเตอรี่..... | 33 |
| 3.3.6.1 การสร้างขั้วในระบบแบตเตอรี่..... | 33 |
| 3.3.6.2 การจัดอุปกรณ์ในระบบแบตเตอรี่..... | 34 |
| 3.3.7 การจัดอุปกรณ์และสร้างขั้วในระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 35 |
| 3.3.7.1 การสร้างขั้วในระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 35 |
| 3.3.7.2 การจัดเครื่องมือในระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 35 |
| 3.3.8 การบรรจุคาร์บอนเพสต์เพื่อเป็นขั้วทำงาน..... | 38 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|-----------|
| 3.3.9 การเช็คสภาพขั้ว..... | 38 |
| 3.3.9.1 ในระบบแบทช์..... | 38 |
| 3.3.9.2 ในระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 38 |
| 3.3.10 การหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการวัด PNP ด้วยระบบแบทช์..... | 39 |
| 3.3.10.1 หาค่าอัตราส่วนของผงแกรไฟต์และพาราฟินออยล์ที่เหมาะสมในการวัด PNP..... | 39 |
| 3.3.10.2 การหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการวัด PNP..... | 39 |
| 3.3.11 หาสภาวะที่เหมาะสมในการวัด PNP ด้วยระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 40 |
| 3.3.11.1 หาค่าอัตราเร็วที่เหมาะสมของตัวพา..... | 40 |
| 3.3.11.2 หาพีเอชที่เหมาะสมของตัวพา..... | 40 |
| 3.3.11.3 หาปริมาตรของสารตัวอย่างที่เหมาะสม..... | 41 |
| 3.3.12 ศึกษาการตรวจวัด MP ด้วยขั้วเอนไซม์ตรึงด้วยระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 41 |
| 3.3.12.1 การตรึงเอนไซม์บนขั้วคาร์บอนเพสต์..... | 41 |
| 3.3.12.2 ตรวจวัด MP ด้วยสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด PNP และเปรียบเทียบกับกรวัด PNP ด้วยขั้วชนิดต่างๆ..... | 41 |
| 3.3.13 ศึกษาสมบัติของขั้วเอนไซม์ตรึงในการตรวจวัด MP ด้วยระบบการไหลต่อเนื่อง.... | 42 |
| 3.3.13.1 การตอบสนองเชิงเส้น (linear range)..... | 42 |
| 3.3.13.2 สภาพไวของขั้วเอนไซม์ตรึง (Sensitivity)..... | 42 |
| 3.3.13.3 ขีดจำกัดในการตรวจวัด (Detection limit)..... | 42 |
| 3.3.13.4 อายุการใช้งาน (life time)..... | 42 |
| 3.3.13.5 ความเป็นรีโพรดูซิบิลิตีในการตรึงเอนไซม์ (Reproducibility)..... | 42 |
| บทที่ 4. ผลและอภิปรายผลการทดลอง..... | 44 |
| 4.1 ทดสอบการย่อยสลาย MP ของเชื้อ <i>Burkholderia cepacia</i> | 44 |
| 4.2 ผลการเจริญเติบโตของ <i>Burkholderia cepacia</i> ในอาหาร LB + MP 10 ppm..... | 45 |
| 4.3 พีเอชที่เหมาะสมในการหาแอกทิวิตี..... | 47 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|--|-----------|
| 4.4 ความเสถียรภาพของเอนไซม์ในช่วง 1 สัปดาห์..... | 47 |
| 4.5 การเช็คสภาพขั้ว..... | 48 |
| 4.5.1 ในระบบแบทช์..... | 48 |
| 4.5.2 ในระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 49 |
| 4.6 ผลการหาอัตราส่วนผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ที่เหมาะสม..... | 50 |
| 4.7 ผลของศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการตรวจวัด PNP..... | 51 |
| 4.8 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัด PNP ด้วยระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 52 |
| 4.8.1 ผลของอัตราเร็วของตัวพา..... | 52 |
| 4.8.2 ผลของพีเอชของตัวพา..... | 53 |
| 4.8.3 ผลของปริมาตรสารตัวอย่าง..... | 53 |
| 4.9 ผลการตรวจวัด MP ด้วยสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด PNP และเปรียบเทียบกับกรวัด PNP ด้วยขั้วชนิดต่างๆ..... | 54 |
| 4.10 สมบัติของขั้วเอนไซม์ตรึง (Immobilized enzyme electrode)..... | 56 |
| 4.10.1 การตอบสนองเชิงเส้น (linear range)..... | 56 |
| 4.10.2 สภาพไวของขั้ว (Sensitivity)..... | 56 |
| 4.10.3 ขีดจำกัดความเข้มข้นในการวิเคราะห์ (Detection limit)..... | 56 |
| 4.10.4 อายุการใช้งานของขั้ว (life time)..... | 56 |
| 4.10.5 ความเป็นรีโพรดูซิเบิลในการตรึงเอนไซม์ (Reproducibility)..... | 57 |
| บทที่ 5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... | 58 |
| บรรณานุกรม..... | 59 |
| ภาคผนวก..... | 64 |
| ภาคผนวก ก. การเตรียมสารละลาย..... | 64 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|--|------|
| ภาคผนวก ข. ข้อมูลผลการทดลอง..... | 65 |
| ข.1 การวัดการเจริญเติบโตและการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์..... | 65 |
| ข.1.1 ผลการวัดการเจริญเติบโต..... | 65 |
| ข.1.2 หาปริมาณโปรตีน..... | 66 |
| ข.1.3 หาแอกทิวิตีของเอนไซม์ในเวลา 20 นาที..... | 67 |
| ข.2 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของการวัด PNP ด้วยขั้วคาร์บอนเพสต์ ในระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 72 |
| ข.2.1 ผลของอัตราการไหลในการวัด PNP..... | 72 |
| ข.2.2 ผลของพีเอชในการตรวจวัด PNP..... | 77 |
| ข.2.3 ผลของปริมาตรสารตัวอย่าง..... | 79 |
| ข.3 ผลการตรวจวัด MP ด้วยขั้วเอนไซม์ตรึงในระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 82 |
| ข.3.1 ผลการตรวจวัด MP ด้วยขั้ว Modified..... | 82 |
| ข.3.2 ผลการตรวจวัด MP ด้วยขั้วเอนไซม์ตรึง..... | 82 |
| ข.3.3 ผลการตรวจวัด PNP ด้วยขั้วเอนไซม์ตรึง..... | 82 |
| ข.4 สมบัติของขั้วเอนไซม์ตรึงในการตรวจวัด MP ด้วยระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 86 |
| ข.4.1 การคำนวณหาการตอบสนองเชิงเส้น และสภาพไว..... | 86 |
| ข.4.2 ขีดจำกัดในการตรวจวัด (Detection limit)..... | 88 |
| ข.4.3 อายุการใช้งานของขั้วเอนไซม์ตรึง..... | 89 |
| ข.4.4 ความมีรีโพรดูซิเบิลิตีในการตรึงเอนไซม์..... | 90 |
| ประวัติผู้เขียน..... | 91 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|---------------|--|
| ตารางที่ 2.1 | ความเป็นพิษของเมทิลพาราไทออนในหนู.....5 |
| ตารางที่ 2.2 | ความเป็นพิษของพาราโนโทรพีนอลในหนู.....9 |
| ตารางที่ 2.3 | เทคนิคต่างๆ ที่ทำให้เซลล์แตก.....13 |
| ตารางที่ 2.4 | ข้อดีและข้อเสียของ Bioreceptor ที่ใช้สำหรับ ไบโอเซนเซอร์.....23 |
| ตารางที่ 2.5 | ชนิดของทรานสดิวเซอร์.....23 |
| ตารางที่ 4.1 | แอกทิวิตีของเอนไซม์ที่พีเอช ต่างๆ.....47 |
| ตารางที่ ๑.1 | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของเซลล์ <i>Burkholderia cepacia</i> ในอาหาร LB ภายในเวลา 24 ชั่วโมง.....67 |
| ตารางที่ ๑.2 | ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานของการหาปริมาณโปรตีน.....68 |
| ตารางที่ ๑.3 | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างของ PNP.....70 |
| ตารางที่ ๑.4 | พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ๑.3.....72 |
| ตารางที่ ๑.5 | พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ๑.4.....73 |
| ตารางที่ ๑.6 | พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ๑.5.....74 |
| ตารางที่ ๑.7 | พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ๑.6.....75 |
| ตารางที่ ๑.8 | พื้นที่ใต้พีคของ PNP ที่อัตราการไหลต่างๆ.....76 |
| ตารางที่ ๑.9 | พื้นที่ใต้พีคของรูป ๑.7.....77 |
| ตารางที่ ๑.10 | พื้นที่ใต้พีคของ PNP ที่พีเอชต่างๆของ Tris-HCl 0.1 M.....78 |
| ตารางที่ ๑.11 | พื้นที่ใต้พีคของรูป ๑.8.....79 |
| ตารางที่ ๑.12 | พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ๑.9.....80 |
| ตารางที่ ๑.13 | พื้นที่ใต้พีคของ PNP ที่ปริมาตรสารตัวอย่าง 10, 20, และ 30 μ L.....81 |
| ตารางที่ ๑.14 | พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ๑.10.....82 |
| ตารางที่ ๑.15 | พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ๑.11.....83 |
| ตารางที่ ๑.16 | พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ๑.12.....84 |
| ตารางที่ ๑.17 | ผลการวิเคราะห์ MP และ PNP ด้วยวิธีชนิดต่างๆ.....85 |

สารบัญตาราง(ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ ข.18 ข้อมูลการคำนวณเพื่อสร้างสมการเส้นตรงจากช่วงความเป็นเส้นตรง ของข้อมูลที่ตรวจวัดได้..... | 86 |
| ตารางที่ ข.19 การสร้างกราฟ linear regression จากสมการที่คำนวณได้..... | 87 |
| ตารางที่ ข.20 พื้นที่ฟีกของแบลงค์ที่เวลา 200-2000 วินาที..... | 88 |
| ตารางที่ ข.21 พื้นที่ใต้ฟีกของ MP 60 ppm ในการทดลอง 10 ครั้ง ในเวลา 1 วัน..... | 89 |
| ตารางที่ ข.22 พื้นที่ใต้ฟีกของ MP 60 ppm ในการทดลอง 1 ครั้งในเวลา 7 วัน..... | 89 |
| ตารางที่ ข.23 พื้นที่ใต้ฟีกของการตรวจวัดMP 60 ppm ในการตรึงเอนไซม์ 5 ครั้ง บนข้าวคาร์บอนเพสต์..... | 90 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | หน้า |
|-------------|---|
| รูปที่ 2.1 | โครงสร้าง เมทิลพาราไทออน.....4 |
| รูปที่ 2.2 | ปฏิกิริยาการทำงานของอะซิetylโคลีนเอสเทอร์เรสต่ออะซิetylโคลีนในใยประสาท ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม.....6 |
| รูปที่ 2.3 | กระบวนการย่อยสลายเมทิลพาราไทออน เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของ จุลินทรีย์7 |
| รูปที่ 2.4 | โครงสร้างของพาราไนโตรฟินอล (PNP).....8 |
| รูปที่ 2.5 | กระบวนการย่อยสลาย PNP โดยจุลินทรีย์.....10 |
| รูปที่ 2.6 | การเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์.....11 |
| รูปที่ 2.7 | แบบจำลองการตรึงเอนไซม์วิธีต่างๆ.....16 |
| รูปที่ 2.8 | จำลองการตรึงเอนไซม์ โดย carrier cross-linking.....18 |
| รูปที่ 2.9 | แบบจำลองกลไกการทำงานของเอนไซม์.....19 |
| รูปที่ 2.10 | ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของสารกำจัดแมลงพาราไทออน.....20 |
| รูปที่ 2.11 | เซลล์ <i>Burkholderia cepacia</i> จาก Richard Golestein วารสาร Bacterio 1995;177....21 |
| รูปที่ 2.12 | องค์ประกอบของไบโอเซนเซอร์.....22 |
| รูปที่ 2.13 | แบบจำลองการเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าขั้วใน thin-layer flow cell.....26 |
| รูปที่ 3.1 | การสร้างขั้วทำงานในระบบแบทช์.....33 |
| รูปที่ 3.2 | การจัดอุปกรณ์ในระบบแบทช์.....34 |
| รูปที่ 3.3 | การจัดวางขั้วในระบบแบทช์.....34 |
| รูปที่ 3.4 | การสร้างขั้วทำงานในระบบการไหลต่อเนื่อง.....35 |
| รูปที่ 3.5 | แบบจำลองเครื่องมือในระบบการไหลต่อเนื่อง.....35 |
| รูปที่ 3.6 | การจัดเครื่องมือในระบบการไหลต่อเนื่อง.....36 |
| รูปที่ 3.7 | การเชื่อม Flow-through thin-layer electrochemical cell กับ BAS liquid chromatography.....36 |
| รูปที่ 3.8 | Flow-through thin-layer electrochemical cell และ แบบจำลอง การประกอบส่วนต่างๆของ Flow-through thin-layer electrochemical cell37 |

สารบัญญรูป(ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 3.9 การบรรจุและขัดผิวหน้าข้าวก่อนใช้งาน..... | 38 |
| รูปที่ 4.1 การรอดของแบคทีเรีย 3 ชนิดในอาหาร LB ที่มีการเติมสารกำจัดแมลง MP 5,000 ppm (Folidol E605 M 50)..... | 44 |
| รูปที่ 4.2 วงสีเหลืองที่เกิดจากการย่อยสลาย MP เป็น PNP ของ <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC25416..... | 45 |
| รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโตของเซลล์ <i>Burkholderia cepacia</i> ในอาหาร LB+MP 10 ppm ในเวลา 24 ชั่วโมง..... | 46 |
| รูปที่ 4.4 ผลการทำงานของเอนไซม์ในเวลา 1 สัปดาห์..... | 47 |
| รูปที่ 4.5 ของข้าวคาร์บอนเพสต์ที่มีผิวหน้าข้าวเรียบนำสัญญาณได้ดี..... | 48 |
| รูปที่ 4.6 ไชคลิกโวลแทมโมแกรมของของข้าวคาร์บอนเพสต์ที่มีผิวหน้าข้าวไม่เรียบ หรือนำสัญญาณได้ไม่ดี..... | 48 |
| รูปที่ 4.7 กระแสที่เกิดขึ้นจากสภาพข้าวที่ดีในระบบการไหลต่อเนื่อง..... | 49 |
| รูปที่ 4.8 กระแสที่เกิดขึ้นจากสภาพข้าวที่มีปัญหาผิวหน้าไม่เรียบหรือตัวนำสัญญาณไม่ดี..... | 49 |
| รูปที่ 4.9 ไชคลิกโวลแทมโมแกรมของ PNP 10 ppm ที่อัตราส่วนผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ต่างๆ..... | 50 |
| รูปที่ 4.10 ไชคลิกโวลแทมโมแกรมของ PNP 10 ppm ใน Tris- HCl 0.1 M pH 8.0..... | 51 |
| รูปที่ 4.11 ไชคลิกโวลแทมโมแกรมของ MP 10 ppm ใน Tris- HCl 0.1 M pH 8.0..... | 51 |
| รูปที่ 4.12 ผลของอัตราเร็วของตัวพาในการตรวจวัด PNP..... | 52 |
| รูปที่ 4.13 ผลของพีเอชของตัวพา Tris-HCl 0.1 M ในการตรวจวัด PNP..... | 53 |
| รูปที่ 4.14 ผลของปริมาตรสารตัวอย่างในการตรวจวัด PNP..... | 53 |
| รูปที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์ MP และ PNP ด้วยข้าวชนิดต่างๆ..... | 54 |
| รูปที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ MP ด้วยข้าวปรับสภาพและข้าวเอนไซม์ตรึง..... | 55 |
| รูปที่ 4.17 ผลของข้าวเอนไซม์ตรึงในการใช้งาน 1 วัน 12 ครั้ง..... | 56 |
| รูปที่ 4.18 ผลของอายุการใช้งานของข้าวเอนไซม์ตรึง 1 ครั้งในเวลา 7 วัน..... | 57 |
| รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐาน BSA ในการหาปริมาณโปรตีน..... | 69 |
| รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐาน PNP ในการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์..... | 70 |

สารบัญรูป(ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ ข.3 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L อัตราเร็วของตัวพา 0.3 mL/min..... | 72 |
| รูปที่ ข.4 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L อัตราเร็วของตัวพา 0.25 mL/min..... | 73 |
| รูปที่ ข.5 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L อัตราเร็วของตัวพา 0.20 mL/min..... | 74 |
| รูปที่ ข.6 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L อัตราเร็วของตัวพา 0.15 mL/min..... | 75 |
| รูปที่ ข.7 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 7.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L อัตราเร็วของตัวพา 0.3 mL/min..... | 77 |
| รูปที่ ข.8 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 อัตราเร็วของตัวพา 0.2 mL/min ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 10 μ L..... | 79 |
| รูปที่ ข.9 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 อัตราเร็วของตัวพา 0.2 mL/min ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 μ L..... | 80 |
| รูปที่ ข.10 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ MP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 อัตราเร็วของตัวพา 0.2 mL/min ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 μ L..... | 82 |
| รูปที่ ข.11 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ MP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V อัตราเร็วของตัวพา 0.2 mL/min ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 μ L..... | 83 |
| รูปที่ ข.12 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 อัตราเร็วของตัวพา 0.2 mL/min ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 μ L..... | 84 |
| รูปที่ ข.13 กราฟเส้น linear regression จากสมการเส้นตรงของการตรวจวัด MP ด้วยหัวเอนไซม์ตรี้ง..... | 87 |

สัญลักษณ์และคำย่อ

| | |
|----------------------------|----------------------------|
| คำย่อ | ความหมาย |
| μL | ไมโครลิตร |
| μM | ไมโครโมลาร์ |
| $\mu\text{mol}/\text{min}$ | ไมโครโมลต่อนาที |
| $^{\circ}\text{C}$ | องศาเซลเซียส |
| Abs | Absorbance |
| AchE | Acetylcholinesterase |
| BSA | Bovine serum albumin |
| DEPA | Diethylthiophosphoric |
| g/mol | กรัมต่อโมล |
| KD | Kilodalton |
| LB | Luria Broth |
| mg | มิลลิกรัม |
| mg/kg | มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม |
| mg/L | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| min | นาที |
| mL/min | มิลลิลิตร/นาที |
| mm | มิลลิเมตร |
| mM | มิลลิโมลาร์ |
| MP | Methyl parathion |
| ng | นาโนกรัม |
| OP | Organophosphate |
| OPH | ออร์แกนโนฟอสฟอรัส ไฮโดรเลส |
| Opd | Organophosphate-degrading |
| PNP | p-nitrophenol |
| ppb | $\mu\text{g}/\text{L}$ |
| ppm | mg/mL |
| s | วินาที |
| V | โวลต์ |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีภูมิประเทศเหมาะสมกับการทำเกษตรกรรม ผลผลิตทางการเกษตรจัดเป็นสินค้าสำคัญทั้งภายในและภายนอกประเทศ จึงมีการพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อให้ผลผลิตทางการเกษตรที่สูงขึ้น การใช้สารกำจัดแมลงเป็นแนวทางหนึ่งที่เกษตรกรนำมาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้มากขึ้น สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตเป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการกำจัดแมลงของกลุ่มเกษตรกรในประเทศไทย

ในช่วงพ.ศ. 2495 – 2505 เริ่มมีการใช้สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตมากขึ้น เพราะแมลงเริ่มติดกับสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนคลอรีน (Organochlorine) ซึ่งมีผลตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้มากกว่า ในขณะที่สารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตมีประสิทธิภาพดีในการกำจัดแมลงและสลายตัวในสิ่งแวดล้อมได้ง่ายกว่าเพราะมีสมบัติดังนี้

1. มีความคงทนในสิ่งแวดล้อมต่ำ
2. ละลายน้ำได้และเกิดไฮโดรไลซิสได้เร็ว
3. เป็นสารออกฤทธิ์ในวงกว้างมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงสูง
4. เป็นพิษสูงสุด(super toxic) ต่อแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

อย่างไรก็ตาม จากการประชุมวิชาการของวัดภูมิพิช (2540) ระบุว่าสารกลุ่มนี้หลายชนิด เช่น มอนอโครโทฟอส เมทามิโดฟอส ฟอสฟามิดอล เมทิลพาราไทออน พาราไทออน เป็นสารที่มีพิษเฉียบพลัน และมีรายงานว่าตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร หลายชนิดเช่น องุ่น พุทรา ชมพู แดงโม แดงกวา หัวหอม ผักคะน้า ผักกาด และส้มเปลือกหนา เป็นต้น ถ้ามนุษย์ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรับประทานผัก ผลไม้ที่มีการตกค้างของสารกลุ่มดังกล่าว ก็จะได้รับพิษเช่นเดียวกับแมลงเช่นกัน

จากความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้ จึงได้มีการศึกษาปริมาณที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม เช่น ในน้ำ ผัก ผลไม้ วิธีการหาปริมาณมีด้วยกันหลายวิธี ที่นิยมในประเทศไทยคือ การวิเคราะห์ด้วย GC และ HPLC ทั้งสองวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง แต่มีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน เครื่องมือมีราคาสูง การใช้เอนไซม์เป็นอีกวิธีหนึ่งในการวิเคราะห์ แม้ว่าจะมีความแม่นยำต่ำ แต่มีความจำเพาะเจาะจงสูง รวดเร็ว เครื่องมือราคาถูก จึงมีการพัฒนาการวิเคราะห์สารสกัดแมลงกลุ่มนี้โดยใช้เอนไซม์มากขึ้น เช่นการตรึงเอนไซม์ อะซิทิลโคลีนเอสเตอเรสบนขั้ว เรียกว่าขั้ว AchE-modified electrode และตรวจวัดสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้โดยอาศัย

ผลของการยับยั้งเอนไซม์จากสารกำจัดแมลง ถ้ามีการยับยั้งมากแสดงว่ามีสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้อยู่มาก

มีรายงานจาก Sack, et al. (2000) ระบุว่าแบคทีเรียในดิน คือ *Pseudomonas diminuta* และ *Flavobacterium* spp. ที่ปนเปื้อนในดินที่มีสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตสามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้ได้ เมื่อมีการสกัดเอนไซม์จากแบคทีเรียสองชนิดนี้ไปตรึงเอนไซม์บน screen print electrode แล้วตรวจวัดสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้จากสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ในขณะที่ Keprasertsup, et al. (2001) ศึกษาการย่อยสลาย เมทิลพาราไทออน ด้วยแบคทีเรียที่สกัดจากดินบริเวณตลิ่งชัน กรุงเทพฯ พบว่าเชื้อ *Burkholderia cepacia* สามารถย่อยสลาย เมทิลพาราไทออนได้รวดเร็วมาก

จึงเป็นที่น่าสนใจในการสกัดเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดนี้มาใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ของเมทิลพาราไทออน แล้ววิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ คือ พาราไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์พาราไนโตรฟีนอลมีหลายวิธี วิธีแอมเพอโรเมทรีในระบบการไหลต่อเนื่อง โดยใช้ขั้วคาร์บอนเพสต์ เป็นวิธีการหนึ่งที่สะดวก รวดเร็ว และลดปัญหาการเกิดเป็นฟิล์ม (passivation) ที่ผิวหน้าขั้ว

ในการทดลองจึงทำการสกัดเอนไซม์ไฮโดรเลส (Hydrolase) มาตรึงบนขั้วคาร์บอนเพสต์ เพื่อไฮโดรไลส์ (Hydrolyse) เมทิลพาราไทออน แล้วใช้วิธีแอมเพอโรเมทรี แบบการไหลต่อเนื่องวิเคราะห์พาราไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

วิเคราะห์เมทิลพาราไทออน โดยการตรึงเอนไซม์ที่แยกได้จาก *Burkholderia cepacia* บนขั้วคาร์บอนเพสต์และตรวจวัด พาราไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีแอมเพอโรเมทรี

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 สกัดและหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์จาก *Burkholderia cepacia*

1.3.1.1 ทดสอบการย่อยสลาย MP

1.3.1.2 หาการเจริญเติบโตของ *Burkholderia cepacia*

1.3.1.3 แยกเอนไซม์จาก *Burkholderia cepacia*

1.3.1.4 หาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

1.3.1.5 หาเสถียรภาพของเอนไซม์ในเวลา 1 สัปดาห์

1.3.2 วิเคราะห์เมทิลพาราไทออนด้วยวิธีแอมเพอโรเมทรี

1.3.2.1 สร้างขั้วทำงานในระบบแบบแท่งและระบบการไหลต่อเนื่อง

1.3.2.2 หาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการตรวจวัดพาราไนโตรฟินอลในระบบแบบแท่ง

1.3.2.3 หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดพาราไนโตรฟินอลด้วยระบบการไหลต่อเนื่อง

1.3.2.4 ตรวจวัด MP โดยใช้ขั้วเอนไซม์ตรึงด้วยสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด PNP

1.3.2.5 ศึกษาสมบัติของขั้วไฟฟ้าในการวิเคราะห์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถใช้ประโยชน์จากแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia*

1.4.2 เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจวัดสารกำจัดแมลงได้อย่างรวดเร็ว ราคาถูก

บทที่ 2

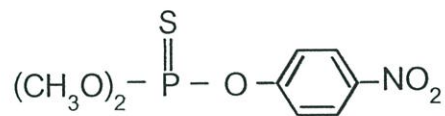
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สมบัติของเมทิลพาราไทออน (Methyl Parathion) (Keprasertsup 1995 และ Yamkunthong 2000)

2.1.1 ชื่อ สมบัติทางกายภาพ และทางเคมี

สูตรโมเลกุล : $C_8H_{10}NO_5PS$

สูตรโครงสร้าง :



รูปที่ 2.1 โครงสร้าง เมทิลพาราไทออน

ชื่อสามัญ : เมทิลพาราไทออน พาราไทออน เมทิล

ชื่อ : IUPAC O,O-Dimethyl O-4-nitrophenyl phosphothioate

ชื่ออื่นๆ : Dimethylfenitrothion , dimethyl para-nitrophenyl , monothio phosphate

O,O-dimethyl O-(paranitrophenyl)phosphothioate, dimethyl para-nitrophenylthionate
dimethyl 4-nitrophenyl phosphorothioate, O,O-dimethyl O-(para nitrophenyl)thionophosphate,
dimethyl parathion, metaphos E601, methyl parathion 8056 HC

ชื่อทางการค้า : a-Gro, Azofos, Bladan M, Divithion, Folidol M, Metacid 50, Methyl E605,
Metafos, Methyl Parathion, Nitrox, Paraset M-50, Paridol, Thylpar M-50, Toll, Wofatox, Folidol E605
M50

ชื่อย่อ : MP

สมบัติทางกายภาพและเคมี เมทิลพาราไทออนบริสุทธิ์ เป็นผลึกสีขาว สำหรับเกรดเทคนิค จะเป็นของเหลวสีเหลืองอำพันคล้ายน้ำมัน มีกลิ่นคล้ายๆ กระเทียม

| | |
|-------------------------------------|---|
| มวลโมเลกุล (Molecular mass (g/mol)) | 263.33 |
| จุดหลอมเหลว (Melting point (°C)) | 35-36 |
| จุดเดือด (Boiling point (°C)) | 160 ที่ความดัน 1 mmHg |
| ความดันไอ | 1.3mPa(ที่ 20 °C) |
| ความหนาแน่น (g/cm ³) | 1.358 (ที่ 20 °C) |
| ค่าการละลายน้ำ | 55-60 mg/L (ที่ 25°C) |
| การละลายในสารอินทรีย์ | เมทานอล อะซิโตน คีโตน อีเทอร์ เบนซีน ไชลีน ปีโตรเลียม มิเนอรัล ออยล์ |
| ความคงตัว (Stability) | ตัวที่ pH 7 ในสารละลายกรดที่อุณหภูมิห้อง |

2.1.2 ความเป็นพิษของเมทิลพาราไทออน (Toxicity of Methyl Parathion)

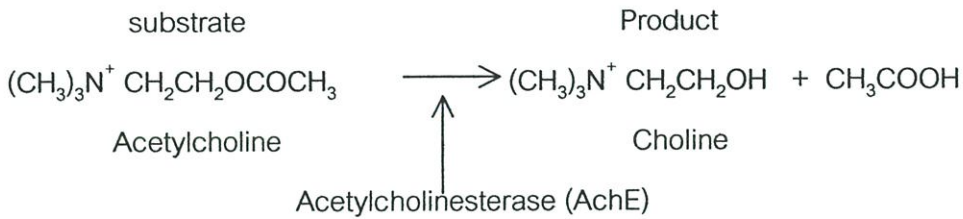
ตารางที่ 2.1 ความเป็นพิษของเมทิลพาราไทออนในหนู

| ความเป็นพิษ | รับทางปาก (oral) | | รับทางผิวหนัง (dermal) | |
|--|------------------|---------|------------------------|---------|
| | males | females | males | females |
| LD ₅₀ (mg/kg) | 14 | 24 | 67 | 67 |
| LD ₁ (mg/kg) | 5.3 | 12 | 49 | 46 |
| ปริมาณน้อยที่สุดที่ทำให้หนูตาย (lowest dose to kill a rat)(mg/kg) | 8.0 | 12 | 60 | 60 |

พิษของเมทิลพาราไทออนเช่นเดียวกับสารออร์แกโนฟอสเฟต คือ จะเป็นพิษในแมลงและสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมดังนี้

สารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสทำให้เกิดการสะสมของอะซิติลโคลีนในใยประสาท ทำให้ร่างกายไม่สามารถส่งสัญญาณไฟฟ้ากระตุ้นผ่านไป ยัง

ใยประสาทที่อยู่ถัดไป สิ่งมีชีวิตที่มีการสะสมของอะซิติลโคลีนจะมีอาการทางประสาทและกล้ามเนื้อ เกิดการชักกระตุกวิงเวียนศีรษะ และถึงตายในที่สุด โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังนี้



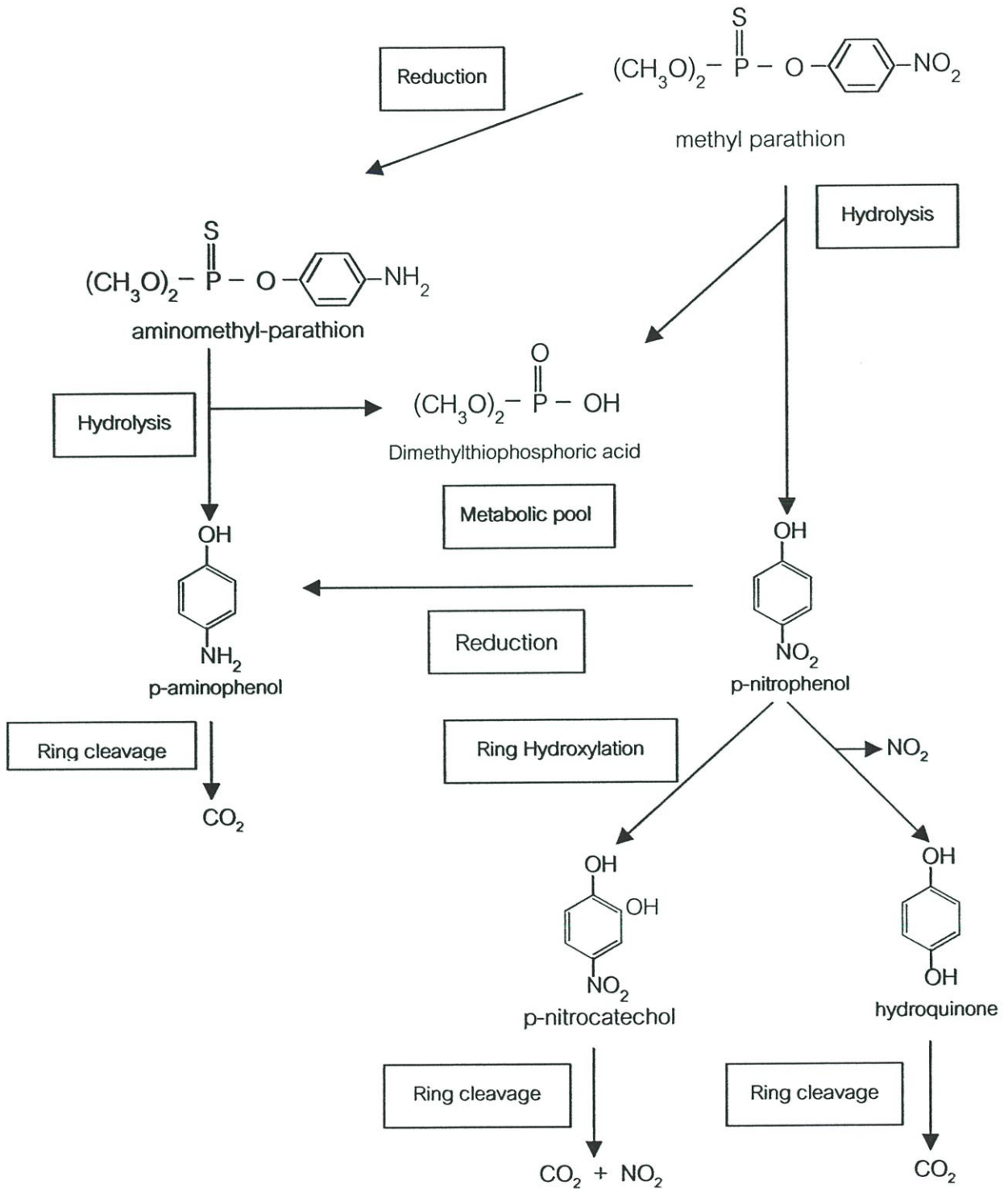
รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาการทำงานของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสต่อ อะซิติลโคลีนในใยประสาทของสัตว์ เลี้ยงลูกด้วยนม

2.1.3 การย่อยสลาย เมทิลพาราไทออนโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์จะใช้ เมทิลพาราไทออนในกระบวนการเมแทบอลิซึมเช่นเดียวกับสารกำจัดแมลงกลุ่ม ออร์แกโนฟอสเฟตตัวอื่นๆ โดยปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องมี 3 ปฏิกิริยาดังนี้

1. ออกซิเดชัน (oxidation) ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นในสัตว์ชั้นสูงมากกว่าในจุลินทรีย์ซึ่งเกิดบ้างแต่น้อย
2. รีดักชัน (reduction) ปฏิกิริยานี้จะเปลี่ยนกลุ่มไนโตร (nitro group) เป็นกลุ่มเอมีน (amine) ในระหว่างเกิดกระบวนการ เมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์
3. ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) จะเกิดร่วมกับปฏิกิริยาการสลายตัวทั้ง 2 แบบด้วย เนื่องจาก ออร์แกโนฟอสเฟตมี พันธะ P=O และ P=S เป็นโครงสร้างทั่วไปดังนั้นจึงสามารถเกิดกระบวนการย่อยสลายสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตในน้ำได้ จุลินทรีย์จะใช้เอนไซม์ย่อยสลายเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการ เมแทบอลิซึม

กระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทิลพาราไทออนโดยจุลินทรีย์นั้นจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยารีดักชัน (ดังรูปที่ 2.3) ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ MP เกิดที่พันธะไนโตรฟีนิล (nitrophenyl C-O-P) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นพาราไนโตรฟีนอล (PNP) และ ไดเมทิลไธโอฟอสฟอริก แอซิด (dimethylthiophosphoric acid) หลังจากนั้นพาราไนโตรฟีนอลจะสลายเป็นไนไตรต์ (nitrite) และ ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) และจะสลายต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และไนไตรต์เพื่อเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึม ปฏิกิริยารีดักชันของ MP กลุ่มไนโตรของ MP จะเปลี่ยนเป็น aminomethyl-parathion จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสต่อเป็น พาราอะมิโนฟีนอล (p-aminophenol) และ ไดเมทิลฟอสฟอริกแอซิดและสลายต่อไปจนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดในภาวะที่มี ออกซิเจนน้อยๆ และมีสารอินทรีย์สูงๆ



รูปที่ 2.3 กระบวนการย่อยสลายเมทิลพาราไทออน เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์

(Barik 1984 และ Lal 1982)

2.1.4 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลาย เมทิลพาราไทออน

Pseudomonas sp.(Chaudhry 1988)

Pseudomonas sp.isolate 50541 (Cortez 1989)

Flavobacterium sp. ATCC 27551 (Adhya 1981)

Aufwuchs (Lewis 1981)

Pseudomonas diminuta (Dumas 1990)

Bacillus subtilis (Keprasertsup, et al. 2001)

Burkholderia cepacia (Keprasertsup, et al. 2001)

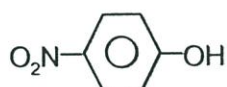
Pseudomonas stutzeri (Yamkunthong 2000)

2.2 สมบัติของพาราไนโตรฟินอล (p-nitrophenol) (Keprasertsup 1995)

2.2.1 ชื่อ สมบัติทางกายภาพและทางเคมี

สูตรโมเลกุล : $C_6H_5NO_3$

สูตรโครงสร้าง :



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของพาราไนโตรฟินอล (PNP)

ชื่อสามัญ : p-nitrophenol 4-nitrophenol

ชื่อIUPAC : 4-hydroxy-1-nitrobenzene

ชื่อทางการค้า : niphen

ชื่อย่อ : PNP

สมบัติทางกายภาพและทางเคมี : PNP บริสุทธิ์เป็นผงสีเหลือง ที่สามารถละลายน้ำและสารอินทรีย์ได้

| | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| มวลโมเลกุล (Molecular mass (g/mol)) | 139.11 |
| จุดหลอมเหลว (Melting point (°C)) | 114-116 |
| จุดเดือด (Boiling point (°C)) | 279 (ที่ 1 mm ของ Hg) |
| ความดันไอ (mm of Hg) | 0.427(ที่ 20 °C) |
| ความหนาแน่น (g/cm ³) | 1.479 (ที่ 20 °C) |
| ค่าการละลายน้ำ | 1.59 กรัมในน้ำ 100 กรัม (ที่ 25°C) |
| การละลายในสารอินทรีย์ | อะซิโตน อีเทอร์ แอลกอฮอล์ |
| ละลายในไขมัน | 113-118 กรัมต่อกิโลกรัม |
| ค่า pH | 5 |

2.2.2 ความเป็นพิษของพาราไนโตรฟินอล (Toxicity of p-nitrophenol)

ตารางที่ 2.2 ความเป็นพิษของพาราไนโตรฟินอลในหนู

| LD ₅₀ (mg/kg) | รับทางปาก (oral)ใน 24 hr | | รับทางผิวหนัง (dermal)ใน 24 hr | |
|--------------------------|--------------------------|---------|--------------------------------|---------|
| | males | females | males | females |
| หนู Rat | 235 | 235 | 1250 | 1024 |
| หนู Mouse | 380 | 470 | - | 1300 |

2.2.3 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าย่อยสลาย พาราไนโตรฟินอล

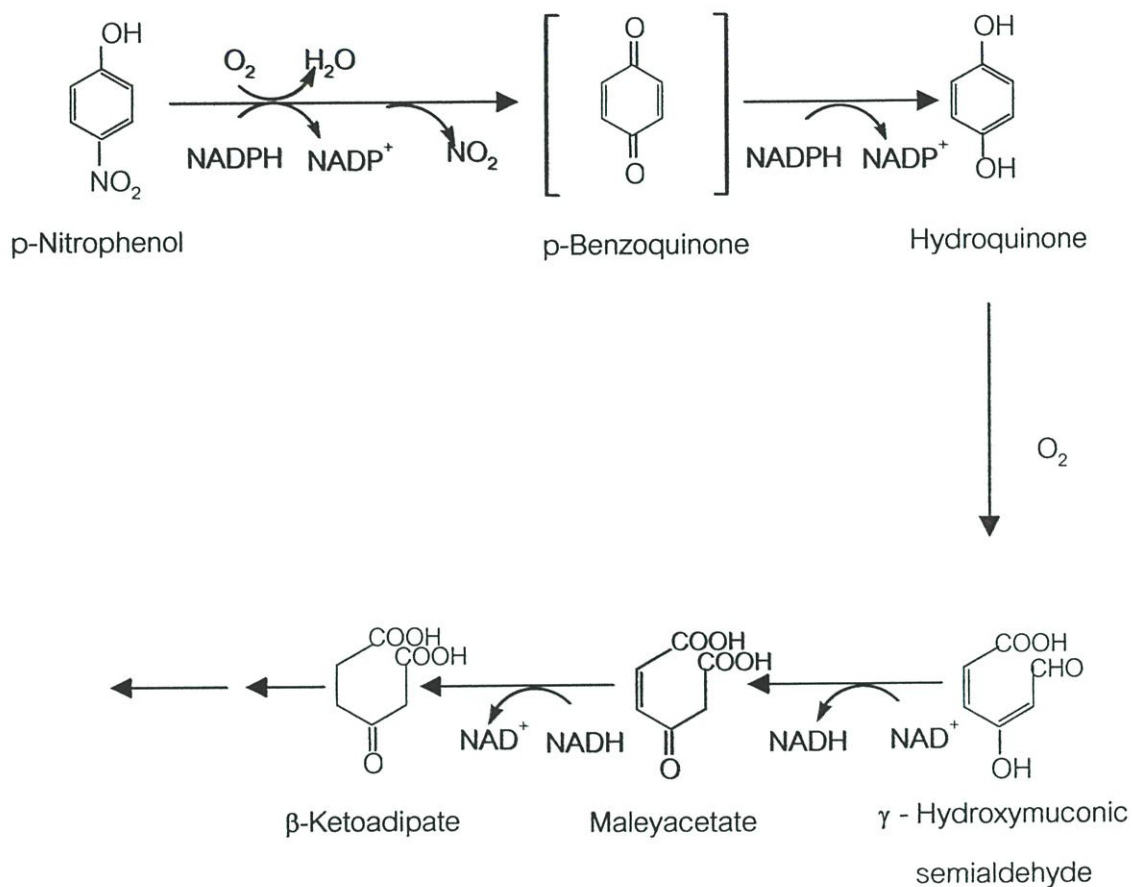
Pseudomonas sp. (Munnecke 1980)

Corynebacterium sp.(Barik, et.al 1976)

Flavobacterium sp. (Raymond and Alexander1971)

Moraxella sp. (Spain and gibson 1991)

กระบวนการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอล เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์
(Spain and Gibson 1991)



รูปที่ 2.5 กระบวนการย่อยสลาย PNP โดยจุลินทรีย์

2.3 การแยกเอนไซม์จากจุลินทรีย์

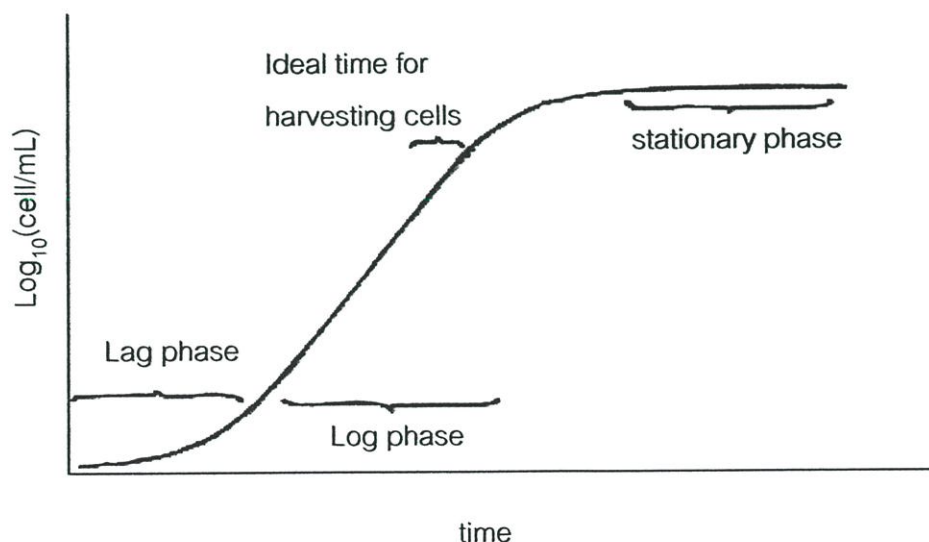
2.3.1 แหล่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์

ก่อนจะทราบว่า การแยกเอนไซม์ในจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณมากที่สุดต้องทราบความหมายของเอนไซม์เสียก่อน

เอนไซม์ เป็นสารโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมีต่างๆในสิ่งมีชีวิต การทำงานของเอนไซม์จะทำงานได้ดีแม้ว่ามีอยู่ในปริมาณน้อยหรืออยู่ในสภาพที่ไม่บริสุทธิ์นัก และหลังจากการทำงานหรือเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ยังสามารถคงสภาพเดิมอยู่ได้ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์มีส่วนของ บริเวณเร่งที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ สับสเตรต ตามทฤษฎี Lock and key การเกิด enzyme-substrate complex จึงเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มจนปฏิกิริยาสิ้นสุด หลังจากนั้นจะได้ผลิตภัณฑ์และเอนไซม์แยกกลับออกมา

การแยกเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เริ่มจากแหล่งของเอนไซม์ก็คือ ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์นั่นเองเนื่องจาก จุลินทรีย์มีขนาดเล็กมาก การแยกเอนไซม์ให้ได้ปริมาณมาก ต้องเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ในอาหารที่เหมาะสม เพื่อให้ได้เซลล์จุลินทรีย์ในปริมาณมากด้วย

ในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ (Media) ชนิดหนึ่งจะให้ได้เซลล์มากที่สุดต้องศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์และสร้างกราฟการเจริญเติบโตเสียก่อนดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์

การเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ ดังรูปที่ 2.6 จะแบ่งเซลล์เป็น 3 ระยะดังนี้

1. lag phase เริ่มมีการเติมจุลินทรีย์ลงไปในอาหารใหม่ จุลินทรีย์อยู่ในระยะปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ ระยะนี้อาจขาดแคลนเอนไซม์และโคเอนไซม์ ทำให้ต้องสังเคราะห์มาใหม่ เพื่อให้เพียงพอกับกิจกรรมภายในเซลล์เพื่อเพิ่มขนาดของเซลล์

2. log phase เซลล์มีการแบ่งตัวสม่ำเสมอด้วยอัตราคงที่ ระยะนี้ประชากรเซลล์จะมีลักษณะคล้ายคลึงกันเกือบทั้งหมด ในแง่ส่วนประกอบทางเคมี เมแทบอลิซึม และสรีรวิทยาอื่นๆ

3. stationary phase จุลินทรีย์มีแนวโน้มหยุดการเจริญเติบโต เพราะอาหารหมดและมีสารพิษจากกิจกรรมของเซลล์มากขึ้น

จากกราฟการเจริญเติบโต การแยกเอนไซม์ให้มากที่สุด ส่วนใหญ่จะแยกในระยะสุดท้ายของ log phase เพราะได้ปริมาณเซลล์ที่สมบูรณ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี ทำให้สามารถแยกเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง

เมื่อได้แหล่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่สมบูรณ์แล้ว ต้องทราบก่อนว่าเอนไซม์ที่สนใจเป็นเอนไซม์ชนิดใด เอนไซม์ในจุลินทรีย์แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

1. Extracellular enzyme เป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ แล้วถูกขับออกมานอกเซลล์
2. Intracellular enzyme เป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อผนังเซลล์ออกสู่ภายนอกได้

Extracellular enzyme นั้นสามารถแยกจากแหล่งผลิตได้ง่าย โดยแยกเอนไซม์ออกจากอาหารและนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้เข้มข้นจะได้เอนไซม์ตามต้องการ แต่ในกรณี Intracellular enzyme ต้องมีขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกเสียก่อนจึงจะแยกเอนไซม์ออกมาได้ ขั้นตอนนี้ถือว่ามีผลสำคัญอย่างยิ่งในการแยก Intracellular enzyme เพราะมีผลกับการทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์และการทำงานของเอนไซม์ ในที่นี้จะสนใจ Intracellular enzyme จึงต้องสนใจวิธีการทำให้เซลล์แตก

2.3.2 การทำให้เซลล์แตก (Cell disruption technique) (Asenjo and Patrick 1990 ; Scope 1987) มี 2 วิธีคือ

1. Mechanical disruption เช่น high-pressure homogenizer, bead mill
2. Chemical disruption เช่น ใช้เบส, เอนไซม์ หรือ detergent treatment

วิธีแรก เซลล์จะแตกได้ดีกว่าวิธีการที่สอง แต่จะทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ ดังนั้นการทดลองควรจะทำในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ ๆ (น้อยกว่า 4 องศาเซลเซียส)

เมื่อทำให้เซลล์แตกแล้ว เอนไซม์ทุกชนิดที่มีอยู่ในเซลล์จะออกมา ขณะนี้จะไม่ทราบว่าเอนไซม์ที่สนใจมีอยู่เท่าใด แต่จะทราบปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ตารางที่ 2.3 เทคนิคต่างๆ ที่ทำให้เซลล์แตก

| Technique | Example | Principle |
|-------------------------------------|--|--|
| Cell lysis | Erythrocytes | Osmotic disruption of cell membrane |
| Enzyme digestion | Lysozyme treatment of bacteria | Cell wall digested , leading to osmotic disruption of cell membrane |
| Chemical solubilization / autolysis | Toluene extraction of yeast Bacteria, plant cells | Cell wall (membrane) partially solubilized chemically;lytic enzymes released complete the process |
| French press | Cell suspensions | Cells forced through small orifice at very high pressure ; shear forces disrupt cells |
| Ultrasonication | Cell suspensions | Microscale highpressure sound waves |
| Bead mill | Cell suspensions | cause disruption by shear forces and cavitation |
| Manton – Gaulin homogenizer | Cell suspensions | Rapid vibration with glass beads rips cell walls off As for French press above, but on a larger scale |

2.3.3 การหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น การวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือ การวัดสีที่เกิดจากสารทดสอบเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีน

ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธี Bradford assay เป็นการหาปริมาณโปรตีนด้วยการวัดสีที่เกิดจากโปรตีนทำปฏิกิริยากับสี Coomassie Brilliant blue G250 โดยโปรตีนจะไปจับกับสีชนิดนี้ในกรดแล้วทำให้ Coomassie Brilliant blue G250 เปลี่ยนโครงสร้างที่ทำให้เกิดสีแดงเป็นโครงสร้างที่ทำให้เกิดสีน้ำเงิน วิธีนี้มีความถูกต้องในช่วงกว้าง 1 - 200 ไมโครกรัมของโปรตีน ง่ายในการทดลอง แต่ถ้ามีสารปนเปื้อนพวกดีเทอร์เจนต์อยู่จะรบกวนผลการทดลอง ซึ่งในการทดลองนี้ไม่ใช้สารพวกนี้

เมื่อหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดได้แล้วต้องทดสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์ เพื่อทำให้ทราบว่าเป็นเอนไซม์ที่เราสนใจอยู่หรือไม่

2.3.4 แอกทิวิตีของเอนไซม์

แอกทิวิตีของเอนไซม์ (นวลพรรณ 2540) การเกิดผลผลิตหรือการใช้สับสเตรตต่อหน่วยเวลา แอกทิวิตีแต่ละชนิดจะแสดงในรูปหน่วย (unit) ต่อกรัม หรือหน่วยต่อมิลลิลิตร ปัจจุบันหน่วยของเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. Arbitrary unit เป็นหน่วยของเอนไซม์ที่กำหนดขึ้นเอง เช่น 1 หน่วยของเอนไซม์กลูโคสอะไมเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม ภายใน 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ หรือ 1 หน่วยของเอนไซม์กลูโคสอะไมเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 10 ไมโครกรัม ภายใน 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

2. Internal unit (IU) เป็นหน่วยสากลของเอนไซม์ที่กำหนดโดยคณะกรรมการเอนไซม์ระหว่างชาติ (Internation Enzyme Commission) 1 IU หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับสเตรต 1 ไมโครโมล ให้เป็นผลผลิตในเวลา 1 นาที ในสภาวะมาตรฐานที่กำหนด

อีกหน่วยหนึ่งที่มีการใช้คือ หน่วยคาทาล (Katal) กำหนดให้ 1 คาทาลเป็นปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับสเตรต 1 โมล เป็นผลผลิต 1 โมล ในเวลา 1 วินาทีในสภาวะมาตรฐานที่กำหนด

2.3.5 การตรึงเอนไซม์

เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized enzyme) หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้อยู่ภายในขอบเขตที่จัดไว้ แต่ยังคงมีความไวต่อปฏิกิริยาสูงกว่า น้อยกว่า หรือเท่ากับเอนไซม์เดิม รวมทั้งสามารถนำมาใช้ซ้ำหรือต่อเนื่องได้ นอกจากนี้เอนไซม์ที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ที่ละลายน้ำไม่ได้ ข้อดีของเอนไซม์ตรึงรูป

1. เพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์
 2. นำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้
 3. เอนไซม์ที่นำมาตรึงไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนก็นำมาใช้ได้ เช่นการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ (เฉพาะ intracellular enzyme เท่านั้น)
 4. สามารถเปลี่ยนสภาวะการทำปฏิกิริยาได้โดยเลือกชนิดของตัวพุง
 5. กำหนดรูปร่างของเอนไซม์ได้ตามชนิดของตัวพุง
 6. สามารถใช้ multienzyme system ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
 7. แอคติวิตีของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น ถ้าตัวพุงมีสารประกอบบางอย่างช่วยเสริมปฏิกิริยา
- ข้อเสียของเอนไซม์ตรึง

1. แอคติวิตีอาจถูกกระทบกระเทือนเนื่องจากการเปลี่ยนโครงแบบ (Conformation) ของเอนไซม์โดยตัวพุงที่ไม่เหมาะสม

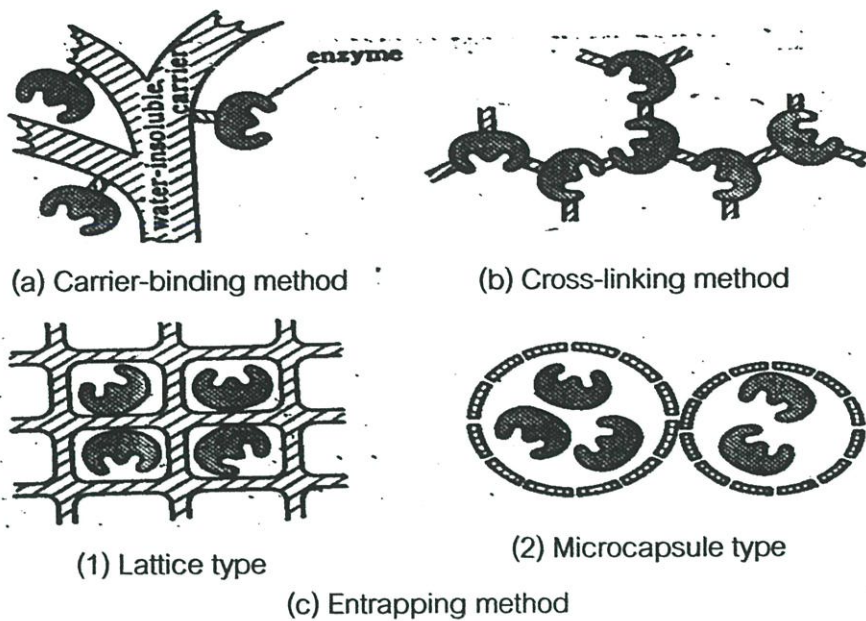
2. ตัวพุงที่ไม่เหมาะสมอาจมีผลกระทบต่อผลผลิต

การตรึงเอนไซม์แบ่งเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ คือ

1. การเชื่อมกับตัวพุง (Carrier-binding method) หมายถึง การเชื่อมเอนไซม์กับตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำวิธีการนี้ยังแบ่งเป็นวิธีย่อยๆ ได้หลายวิธีเช่น การดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption) การสร้างพันธะไอออนิก (Ionic binding) การสร้างพันธะโคเวเลนต์ (Covalent binding) การใช้ไบฟังก์ชันนัลรีเอเจนต์ (Carrier-binding bifunctional reagent)

2. การเชื่อมขวาง (Cross-linking method) หมายถึง การเชื่อมข้ามระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้ตัวกลางซึ่งเชื่อมระหว่าง 2 โมเลกุล (Bifunctional reagent) หรือตัวกลางเชื่อมระหว่างหลายโมเลกุล (multifunctional reagent)

3. การห่อหุ้ม (Entrapping method) หมายถึง การบรรจุเอนไซม์ลงในช่องว่าง หรือโพรง (Lattice) ของเจลที่สามารถซึมผ่านบางส่วน หรือห่อหุ้มเอนไซม์ด้วยเมมเบรนโพลีเมอร์ที่สามารถซึมผ่านบางส่วน (Microcapsule)



รูปที่ 2.7 แบบจำลองการตรึงเอนไซม์วิธีต่างๆ

ก่อนที่จะเลือกวิธีการตรึงเอนไซม์ ต้องคำนึงถึงองค์ประกอบที่มีผลต่อความไวของปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรต คือ

1. ความคงรูปจำเพาะ (Specific conformation) เอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีความคงรูป 3 มิติ ดังนั้นการตรึงเอนไซม์ต้องรักษาความคงรูปเดิมของเอนไซม์ เพื่อให้เอนไซม์คงความไวต่อปฏิกิริยา และต้องไม่ทำให้อนุโมเลกุลกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง หรือโครงร่างทุติยภูมิ (Tertiary structure) เปลี่ยนแปลง มิฉะนั้นจะทำให้ความจำเพาะเจาะจงเปลี่ยนไป

2. จุดเร่ง หรือบริเวณเร่ง (Active center or Active site) บริเวณเร่งประกอบด้วย 2 ส่วน ซึ่งทำหน้าที่ต่างกัน ส่วนที่หนึ่งเป็นบริเวณที่ทำให้เกิดการเร่งของปฏิกิริยา เนื่องจากบริเวณเร่งเป็นโครงร่างที่มีแรงเกาะอ่อน เช่น พันธะไฮโดรเจน ไฮโดรโฟบิก ไอออนิก เพราะฉะนั้นภาวะที่กระทบต่อโครงร่างได้ง่ายคือ อุณหภูมิสูง กรดแก่ ด่างแก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง อาจจะมีผลต่อการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์และลดความไวของปฏิกิริยาอีกส่วนเป็นบริเวณจำเพาะเชื่อมกับสับสเตรตอย่างเจาะจง บริเวณดังกล่าวจะประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด

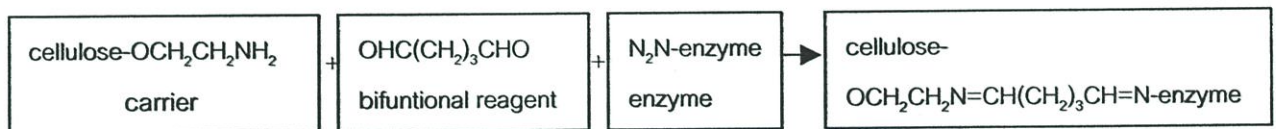
3. กลุ่มต่างๆ ของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเชื่อมพันธะกับตัวพุง กรดอะมิโนอิสระ คาร์บอกซิล ซัลไฟดริลของซิสเตอีน อิมิดาโซลของฮิสเตอีน ฟีนอลิกของไทโรซีน และกลุ่มไฮดรอกซิลของเซรีน

เมื่อทราบถึงองค์ประกอบที่มีผลต่อความไวของปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรต สามารถเลือกวิธีการที่นำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ได้ตั้ง 3 วิธีที่ได้กล่าวถึงในข้างต้น ในที่นี้จะกล่าวถึงการตรึงเอนไซม์แบบการเชื่อมกับตัวพุง (Carrier-binding method) วิธีการหนึ่งคือ การใช้ไบฟังก์ชันนัลรีเอเจนต์ (Carrier-binding with bifunctional reagents)

การเชื่อมกับตัวพุงโดยใช้ไบฟังก์ชันนัลรีเอเจนต์ (Carrier-binding with bifunctional reagents)

เรียกอีกอย่างว่า carrier cross-linking method วิธีนี้อาศัยพื้นฐานการสร้างพันธะเชื่อมขวาง (Cross-links) ระหว่าง กลุ่มอะมิโน (Amino group) ของตัวพุง กับ กลุ่มอะมิโน (Amino group) ของเอนไซม์ โดยอาศัยตัวกลางคือ Bi or multifunctional reagents ตัวที่นิยมใช้มากที่สุดคือ กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) ซึ่งสารตัวนี้ก่อให้เกิดการสร้าง Schiff bases (the condensation product formed between a primary amine and either an aldehyde or ketone) ระหว่าง CHO ของ กลูตารัลดีไฮด์ กับ กลุ่มอะมิโน ของตัวพุงและเอนไซม์

ตัวอย่างการตรึงเอนไซม์วิธีการนี้



ตัวอย่างตัวพุงที่มีกลุ่มอะมิโน ได้แก่

Aminoethyl cellulose (AE-cellulose)

DEAE-cellulose (O-Diethylaminoethyl)-cellulose, an anion exchanger

Amino derivatives of Sepharose

Inactivated albumin

Partially deacylated chitin

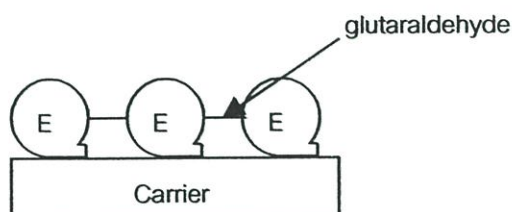
Heated microbial cells

Aminoethyl polyacrylamide (AE-polyacrylamide)

Aminosilane derivatives of porous glass

และในบางกรณีการทำเอนไซม์ตรึงรูปอาจจะทำให้ได้โดยวิธี carrier cross-linking คือ เมื่อให้เอนไซม์ดูดซับทางกายภาพ (Physically adsorbed) ในช่องว่างเช่น glass beads, carbon, silica, alumina หรือพันธะไอออนิก (Ionic bond) บน silica ที่ treat ด้วย polyethyleneimine (PEI) แล้วจากนั้นจึงมา treat

ครั้งสุดท้ายด้วยกลูตารัลดีไฮด์ก็จะได้เอนไซม์ตรึงรูป โดยโมเลกุลของเอนไซม์เชื่อมต่อกันด้วย กลูตารัลดีไฮด์ และติดแน่นปกคลุมส่วนบนของ carrier เรียกกระบวนการนี้ว่า tanning



รูปที่ 2.8 จำลองการตรึงเอนไซม์ โดย carrier cross-linking

2.4 สมบัติของ ออร์แกโนฟอสฟอรัส ไฮโดรเลส (Organophosphorus hydrolase)

IUBMB enzyme Nomenclature : EC 3.1.8.1

ชื่อสามัญ : (common name) : Aryldialkylphosphate

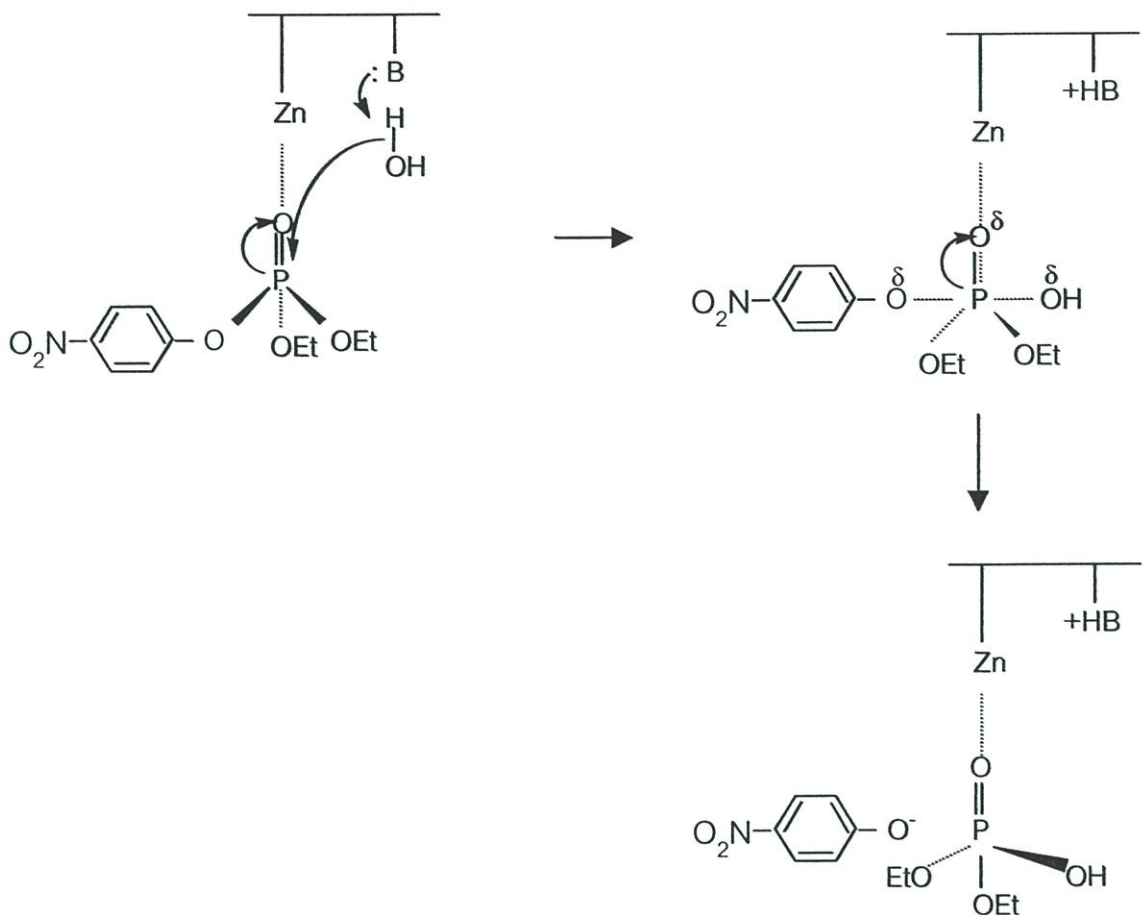
ปฏิกิริยา : (Reaction) : Aryl dialkyl phosphate + H₂O → Dialkyl phosphate + Aryl alcohol

ชื่ออื่นๆ : (other name) : Organophosphate hydrolase, A-esterase, Aryltriphosphate
Organophosphate esterase, Esterase B1, Esterase E4, Paraoxon esterase, Pirimphos-
methyloxon eaterase, OPA anhydrase, Parathion hydrolase, Phosphotriesterase

ชื่อในระบบเอนไซม์ : (systematicname) : Aryltriphosphate dialkylphosphohydrolase

แอกทิวิตีของเอนไซม์ในสารประกอบออร์แกโนฟอสเฟตจะเกี่ยวข้องกับเอสเทอร์ (Esters) ของฟอสฟอนิก (Phosphonic acids) เนื่องจากส่วนที่เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Active site) เป็น ไดวาเลนต์แคตไอออน (Divalent cations) พวกคีเลตติ้งรีเอเจนต์ ซัลไฟดริลรีเอเจนต์ (sulfhydryl) เช่น Dithiothreitol (DTT) หรือพวกเกลือโลหะเช่น CuCl₂ จึงเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

แบบจำลองกลไกการทำงานของเอนไซม์ (Dumas, et al. 1989) ออร์แกโนฟอสฟอรัสไฮโดรเลส



รูปที่ 2.9 แบบจำลองกลไกการทำงานของเอนไซม์

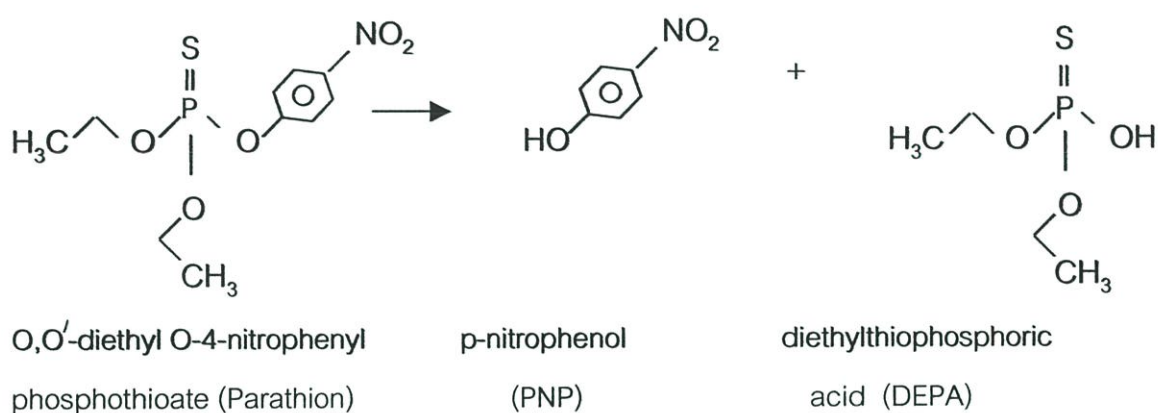
Dumas, et al. (1989) สกัดเอนไซม์ชนิดนี้จาก *Pseudomonas diminuta* ได้ เอนไซม์ มวลโมเลกุลเป็น 39,000 ดาลตัน มี pI (isoelectric point) 8.3 ± 0.1 สารละลายเอนไซม์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการดูดกลืนแสง 1.86 ที่ 280 นาโนเมตร มีแอกทีฟไซต์มีซิงค์ไอออน (Zn^{2+}) อยู่ประมาณ 1 โมลต่อเอนไซม์ 1 โมล

Richins, et al. (2000) ศึกษา พีเอช (pH) ที่เหมาะสม สำหรับการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์บริสุทธิ์อยู่ที่ประมาณ 9.5

Shiamzu (2002) ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ใน 50 มิลลิโมลาร์ ซิเตรด-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ภายหลัง 7 วัน ที่ 25 และ 4 องศาเซลเซียส พบว่าการเร่งปฏิกิริยาจะลดลงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และที่ -20 องศาเซลเซียสใน 50 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล จะลดลงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเก็บโดยการเติม 5 เปอร์เซ็นต์ Bovine serum albumin จะลดลงประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

Sacks, et al.(2000) พบว่าแบคทีเรียในดิน สามารถผลิตเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตได้ แบคทีเรียดังกล่าวคือแบคทีเรีย *Pseudomonas diminuta* และ *Flavobacterium* spp. ซึ่งแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้อาศัยอยู่ในดินที่มีการปนเปื้อนของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต เช่น พาราไทออน

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้ เช่น ปฏิกิริยาของ พาราไทออน ไฮโดรไลซิส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น พาราไนโตรฟินอล และกรดไดเอทิลไทโอฟอสฟอริก ดังรูปที่ 2.10 และปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นได้เร็วขึ้นหากมีเอนไซม์ช่วยเร่ง



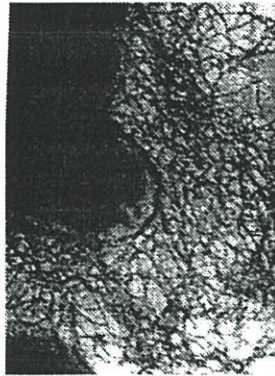
รูปที่ 2.10 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารกำจัดแมลงพาราไทออน

เมื่อมีการสกัดแยกเอนไซม์จากแบคทีเรียมาตรึงบน screen print electrode จึงสามารถตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงดังกล่าวโดยการวัด พาราไนโตรฟินอลที่เกิดขึ้นได้

2.5 ลักษณะของ *Burkholderia cepacia*

Burkholderia cepacia ค้นพบโดย Walt Burkholder ที่ มหาวิทยาลัย Cornell เดิมเรียก *Pseudomonas cepacia* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แบบแท่ง ที่ไม่สร้างสปอร์ ใช้อากาศ ในการดำรงชีวิต ไม่ใช้น้ำตาล พบได้ทั่วไปในดิน น้ำและในผัก และทำให้เกิดรากเน่าในหัวหอม ในปัจจุบันเป็นเชื้อทำให้เกิดเชื้อแฝงต่อมนุษย์ คือเมื่อร่างกายมนุษย์อ่อนแอ เชื้อชนิดนี้จะก่อโรค cystic fibrosis และ chronic granulomatous disease (CGD)

Holmes, et al พบว่าในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาเชื้อชนิดนี้ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ หลายโรคโดยเฉพาะโรค cystic fibrosis (CF) โดยแพร่มาจากอเมริกาเหนือ สู่อังกฤษและที่อื่นในโลกจากผู้ป่วยไปยังคนปกติ ได้มีการนำเชื้อชนิดนี้มากำจัดแมลงทางชีวภาพ และด้านเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช

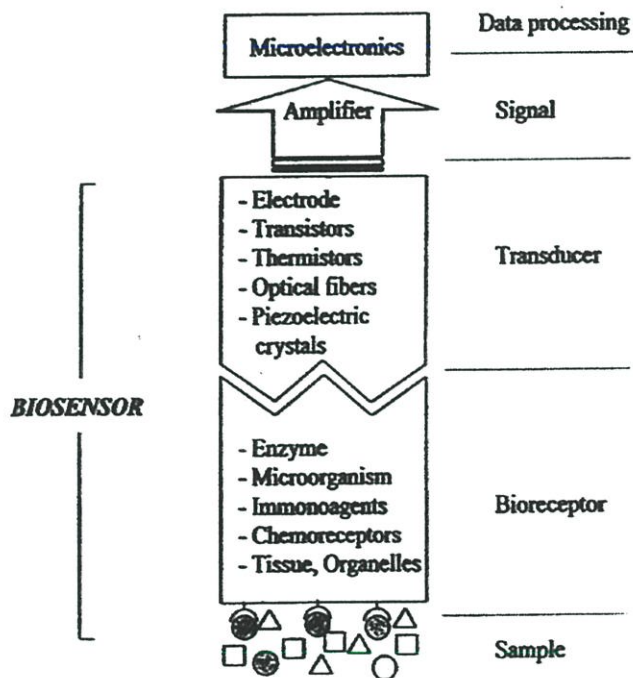


รูปที่ 2.11 เซลล์ *Burkholderia cepacia* จาก Richard Golestein วารสาร Bacterio 1995;177

2.6 ไบโอสเซนเซอร์ (Biosensors)

เริ่มมีบทบาทในด้านการวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์เป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1962 โดย Leland C. Clark Jr และคณะได้สร้างเอนไซม์อิเล็กโทรดขึ้น สำหรับใช้หาปริมาณกลูโคส โดยเอนไซม์กลูโคส ออกซิเดสกับออกซิเจนอิเล็กโทรด (Clark's oxygen electrode) และได้มีการพัฒนาต่อเนื่องเรื่อยมา

ความหมายของไบโอสเซนเซอร์ เกี่ยวกับการตรวจวัดปริมาณสาร โดยอาศัยสารทางชีวภาพที่มีความจำเพาะเจาะจงและว่องไวทางปฏิกิริยาต่อสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ควบคู่กับอุปกรณ์หรือหัววัดที่ทำหน้าที่เป็นทรานสดิวเซอร์ในการรับและแปลงสัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารชีวภาพกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้า



รูปที่ 2.12 องค์ประกอบของไบโอสเซนเซอร์

องค์ประกอบของไบโอสเซนเซอร์

1. Bioreceptor
2. Transducer
3. Amplifier
4. Data processor

Bioreceptor เป็นสารชีวภาพ ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสารตัวอย่างที่สนใจเท่านั้น เช่น เอนไซม์ จุลินทรีย์ เนื้อเยื่อพืชและเนื้อเยื่อสัตว์ สารภูมิโมโน และสารเคมีบางตัวที่จำเพาะเจาะจง

ตารางที่ 2.4 ข้อดีและข้อเสียของ Bioreceptor ที่ใช้สำหรับ ไบโอเซนเซอร์

| ไบโอรีเซปเตอร์ | ข้อดี | ข้อจำกัด |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| เอนไซม์บริสุทธิ์ | มีความจำเพาะเจาะจงสูง | ราคาแพง มีเสถียรภาพต่ำ และเก็บรักษาได้ไม่นาน |
| จุลินทรีย์ | มีหลากหลาย สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ | อันตราย |
| เนื้อเยื่อพืชและสัตว์ | ราคาถูก มีประสิทธิภาพดี | มีสิ่งปนเปื้อนรบกวนสูง |
| สารภูมิโมโน | มีความจำเพาะเจาะจงดีมาก | ราคาสูง เลือกสารมาใช้ยาก |
| ธาตุหรือโครงสร้างสารที่จำเพาะเจาะจง | สภาพการตรวจวัดสูง | อายุการใช้งานต่ำ เก็บรักษา ยากและมีความจำเพาะเจาะจงต่ำ |

ทรานสดิวเซอร์ (Transducer) เป็นตัวเปลี่ยนสัญญาณที่เกิดจากสารชีวภาพเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า การเลือกทรานสดิวเซอร์ขึ้นกับการตรวจวัดสารชีวเคมีที่ออกมา

ตารางที่ 2.5 ชนิดของทรานสดิวเซอร์

| ชนิดของทรานสดิวเซอร์ | ตัวอย่าง |
|----------------------|---|
| Electrochemical | |
| -Potentiometry | Ion-selective electrodes, gas selective electrode, modified metal electrode, field effect transistors |
| -Amperometry | Oxygen electrodes |
| -Conductance | Conductometer |

ตารางที่ 2.5 ต่อ

| ชนิดของทรานสดิวเซอร์ | ตัวอย่าง |
|----------------------|--|
| Optical | Fiber optic ต่อกับ photodiode ของ absorption หรือ fluorescence ,sensitized semiconductor |
| Colorimetry | Thermistor |
| Surface mass change | Piezoelectric crystal resonance |

2.7 แอมเพอโรเมทรี (Amperometry)

เป็นการวัดกระแสที่เกิดขึ้นโดยการให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ โดยมีโพเทนทีออสเตท(Potentiostat) เป็นตัวควบคุมศักย์ไฟฟ้า กระแสอาจเกิดได้จากทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันขึ้นกับการให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมแก่ขั้ว ทำให้ขั้วเป็นได้ทั้งตัวออกซิไดส์หรือตัวรีดิวซ์ขึ้นกับศักย์ไฟฟ้าที่ให้ เทคนิคนี้ การตรวจวัดสารเกิดที่ผิวหน้าขั้ว แต่ไม่ได้หมายความว่าโมเลกุลของสารจะถูกติดอยู่กับขั้ว โมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่มาเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าขั้ว

ทรานสดิวเซอร์ที่ใช้ในเทคนิคแอมเพอโรนี ส่วนใหญ่เป็น thin-layer hydrodynamic chronoamperometry ซึ่งเป็นการวัดกระแสจากขั้วที่เป็นฟิล์มบางๆ ควบคุมศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ขั้วเปรียบเทียบกับเวลาในสารละลายที่มีการกวนอยู่ตลอดเวลา หรือระบบที่มีการไหลผ่านผิวหน้าขั้วที่เป็นฟิล์มบางๆ ฟิล์มนี้มีความหนาต่างๆ ส่วนใหญ่จะประมาณ 15-125 ไมโครเมตร

เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าระหว่าง ขั้วอ้างอิง (Reference electrode) และขั้วทำงาน (Working electrode) เพื่อตรวจวัดปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดขึ้น ในสารละลายที่มีอิเล็กโทรไลต์พอเพียง ศักย์ไฟฟ้าที่ผ่านชั้นบางๆระหว่างผิวหน้าขั้วทำงานและสารละลายภายนอก ทำให้เกิดสนามไฟฟ้าประมาณ 10^5 - 10^6 โวลต์ต่อเซนติเมตรขึ้น

การตรวจวัดแบบแอมเพอโรเมทรีขึ้นกับกฎของฟาราเดย์ (Faraday's law) ดังนี้

$$Q = nFN \quad \dots (1)$$

Q = จำนวนคูลอมบ์

N = จำนวนโมลของสาร

n = จำนวนอิเล็กตรอนต่อโมลของสาร

F = ค่าคงที่ของฟาราเดย์ 96,500 C/equiv

เมื่อ ดิฟ สมการที่ 1 เทียบกับเวลา กระแสที่เกิดขึ้น แสดงดังสมการ

$$\frac{dQ}{dt} = I = nFA \frac{dN}{dt} \quad \dots (2)$$

$t =$ เวลา

$I =$ กระแส

$A =$ พื้นที่หน้าตัดของขั้ว

เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์เคลื่อนที่มายังผิวหน้าขั้ว และได้รับศักย์ไฟฟ้าเพียงพอ สารจะเกิดปฏิกิริยาขึ้น อาจเป็นออกซิเดชันหรือรีดักชันแล้วเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ ภาวะการขนส่งมวล (mass - transport) จะทำให้กระแสเกิดขึ้น สามารถคำนวณหาค่ากระแสที่เกิดขึ้นจาก สัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient, D) และความเข้มข้นเกรเดียนท์ (concentration gradient)

โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารกับระยะทาง (distance), x ที่ผิวหน้าขั้วโดยให้ระยะทางที่ผิวหน้าขั้วเป็น $x = 0$

$$\frac{dc_{x,t}}{dx_{x=0}} \quad \dots (3)$$

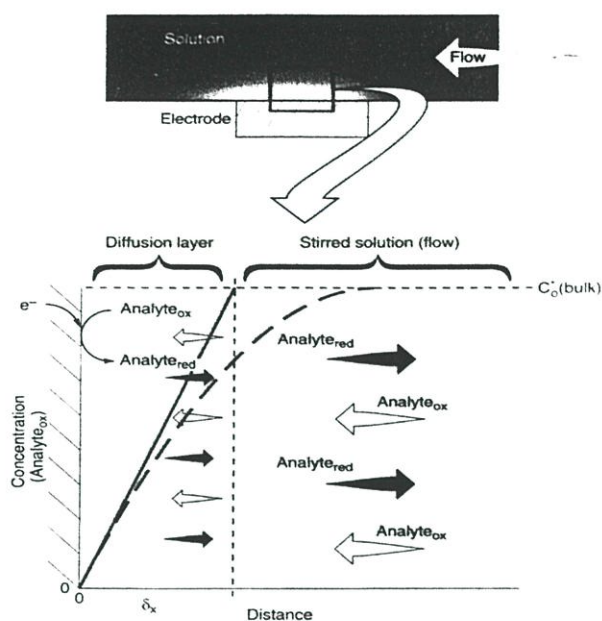
อัตราการขนส่งมวลสาร ($\text{mol cm}^{-2}\text{s}^{-1}$)หาได้จาก

$$\frac{dN}{dt} = -D \left(\frac{dN_{x,t}}{dx_x} \right)_{x=0} \quad \dots (4)$$

เมื่อไปแทนในสมการที่ 2 จะได้ค่าของกระแสเป็น

$$I = -nFAD \left(\frac{dc}{dx} \right)_{x=0} \quad \dots (5)$$

เมื่ออยู่ในภาวะที่อัตราการไหล (flow) คงที่หรือภาวะไฮโดรไดนามิก ความเข้มข้นเกรเดียนท์ มีค่าคงที่เพราะเกิด ชั้นการแพร่ (diffusion layer), δ ไม่เปลี่ยนแปลง ดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 แบบจำลองการเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าขั้วใน Thin-layer flow cell

จากภาพภายใต้ภาวะ hydrodynamic คงที่หรือในขณะที่มีอัตราการไหล ผิวหน้าขั้ว จะแบ่งเป็น 2 ชั้นคือชั้นการแพร่บริเวณใกล้ผิวหน้าขั้ว (Diffusion layer) และชั้นของสารละลายภายนอก (สารละลายมีการคนอยู่ตลอดเวลาหรือมีการไหลของสารตลอดเวลา) จะห่างผิวหน้าขั้วออกไป เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้ามาถึงชั้นการแพร่ที่ผิวหน้าขั้วแล้วเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ สารผลิตภัณฑ์จะออกจากผิวหน้าขั้ว ในขณะเดียวกันสารที่ต้องการวิเคราะห์โมเลกุลอื่นจากสารละลายภายนอกผ่านชั้นการแพร่มาเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าขั้วอีกเป็นเช่นนี้เรื่อยไป ชั้นการแพร่ก็คือ บริเวณที่สารที่ต้องการวิเคราะห์แพร่เข้าใกล้ผิวหน้าขั้ว ด้วยความเข้มข้นแบบเกรเดียนต์แสดงดังเส้นที่บ ส่วนความเข้มข้นที่เกิดจากการแพร่ของสารที่แท้จริงบนผิวหน้าขั้วแสดงดังเส้นประ ทำให้หากระแสที่เกิดขึ้นได้ดังสมการที่ 6

$$I = nFAD \frac{C_0}{\delta} \quad \dots (6)$$

C_0 = ความเข้มข้นของสารที่เกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าขั้ว

δ = diffusion layer

จากสมการที่ (6) กระแสที่วัดได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่ผ่านผิวหน้าขั้วที่หน้าที่เป็นทรานส์ดีวเซอร์

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mulbry and Karns. (1989) สกัดเอนไซม์ parathion hydrolase ให้บริสุทธิ์และหาลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ดังกล่าวไว้ แบคทีเรียแกรมลบ คือ 1. *Flavobacterium* ATCC27551 ได้เอนไซม์มี MW 35KD 2. B-1 ได้เอนไซม์มี MW 43 KD 3. SC ได้เอนไซม์มี MW 67 KD ทั้ง 3 สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ด้วย dithiotheitol, CuCl_2 แต่ B-1 สามารถย่อย O-ethyl-O-4-nitrophenyl phenylphosphosphate ได้เท่าๆ กับ parathion (EPN) *Flavobacterium* ย่อย EPN ได้น้อยกว่า parathion ส่วน SC ไม่สามารถย่อย EPN ได้เลย

Dumas, et al. (1989) สกัดและหาสมบัติของเอนไซม์ phosphotriesterase จาก *Pseudomonas diminuta* ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยการผ่าน gel filtration, ion exchange, hydrophobic และ dye metric chromatography ได้เอนไซม์เป็น 39 KD มี Zn^{2+} อะตอมเดียวที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส OPs

Rainina, et al. (1996) พัฒนาไบโอเซนเซอร์จาก *E.coli* ที่มีการปรับปรุงยีนเพื่อวัด OPs โดยการตรึงด้วยวิธี Cryoimmobilization ตรวจวัดโดย 1. Stirred batch reactor 2. Flow-through column minireactor ระบบที่ 1 มีระยะเวลาในการตอบสนอง 20 นาที ระบบที่ 2 มีระยะเวลาในการตอบสนอง 10 นาที และสามารถเก็บในบัฟเฟอร์ potassium phosphate 50 mM 4°C ได้ 2 เดือน

Mulchandani, et al. (1998) ตรึงเอนไซม์ OPH โดย BSA และ glutaraldehyde บนขั้วเพื่อตรวจการปลดปล่อย H^+ ด้วย Potentiometric มีระยะเวลาในการตอบสนองน้อยกว่า 3 นาที วัด parathion และ paraoxon ได้ในช่วง 0.002-0.4 mM มีความเสถียรนานมากกว่า 1 เดือน เมื่อเก็บใน 1 mM HEPES+100 mM NaCl 4°C ที่ pH 8.5

Mulchandani, et al. (1999) สร้างขั้ว Thick-film Strip แล้วตรึงเอนไซม์ด้วย nafion สามารถตรวจวัด paraoxon และ MP ได้ 40 และ 5 μM ตามลำดับขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุดของ paraoxon วัดได้ 9×10^{-8} M MP วัดได้ 7×10^{-8} M

Wang, et al. (1999) ใช้ขั้วคาร์บอนเพสท์ที่ตรึงเอนไซม์ด้วย Nafion วัด OPs ด้วยวิธี chrono amperometric ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.85 โวลต์ ขีดจำกัดการตรวจวัดในการตรวจวัด MP เป็น 9×10^{-7} M สภาพไว 2.14 nA/ μM

Mulchandani, et al. รายงานผลการทำการวิจัยในช่วง 1995-1998 กับ USEPA ดังนี้

1. ตรึงเซลล์เพื่อศึกษาการย่อย OPs โดยใช้ *E.Coli* ที่มีการใส่ยีน opd และเติม CoCl_2 ที่ระยะ stationary phase (เพื่อ เปลี่ยน active site จาก Zn^{2+} เป็น Co^{2+} จะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น) พบว่า

เมื่อตรึงเซลล์บนแผ่น polypropylene โดยใช้เซลล์ 256 mg/g ของ polypropylene ที่ pH 8 สามารถย่อย OPs ได้ 100% ในเวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมง

ตรึงเซลล์ *E.Coli* บน glass beads โดย adsorption ตามด้วย cross-linking แพคในคอลัมน์เป็น reactor ผ่าน OPs แต่ละชนิดด้วยอัตราการไหลต่างๆ สามารถย่อย OPs ได้มากกว่า 80 % ระบบนี้เก็บที่ pH 8 ได้นาน 3 เดือน

2. พัฒนาการตรวจวัด OPs ด้วยวิธี Potentiometric โดยการตรึงเซลล์ *E.Coli* บน pH electrode ที่มีการดัดแปลงเมื่อจุ่มในสารละลายที่มี OPs จะวัดปริมาณโปรตอนที่ปล่อยออกมาใช้ 2.5 mg ของเซลล์ ที่ pH 8.5 บัฟเฟอร์ HEPES 1 mM สามารถวัด paraoxon, diazinon และ MP ได้ต่ำกว่า 2 M

3. พัฒนาการตรวจวัด OPs ด้วยวิธี Optical biosensor โดยตรึงเซลล์ *E.Coli* ใน agarose ที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ บนแผ่นไนลอนต่อกับสาย fiber optic เมื่อเอนไซม์ย่อย OPs จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะค่าหนึ่งแล้วหักเหแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะค่าหนึ่งที่สามารถ ตรวจวัดได้ด้วย photomultiplier detector พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือใช้เซลล์ 1.5 mg ของเซลล์ ในบัฟเฟอร์ HEPES 1 mM ที่ pH 9 ที่ 30° C และในสภาวะเดียวกันนี้สามารถใช้เอนไซม์ บริสุทธิ์ตรึงด้วย glutaraldehyde ต่อกับ fiber optic ตรวจวัด OPs ได้ผลเป็นที่น่าสนใจเช่นเดียวกัน

4. ใช้วิธีแอมเพอโร โดยการตรึงเอนไซม์ OPH ด้วยวิธี covalent บน porous glass beads แล้วแพคใส่คอลัมน์ ตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วย คาร์บอนเพลลที่ 0.9 โวลต์ พบว่าได้ผลดีกว่าวิธี potentiometric และ fiber-optic

Mulchandani, et al. (2001) ตรึงเซลล์ *Moraxella* sp. บน reactor ดูการย่อย OPs วัด PNP ที่เกิดขึ้นด้วย screen print electrode ที่ศักย์ไฟฟ้าสูงๆ ใช้ตัวเซลล์แห้ง 0.29 mg pH 7 ที่ 25°C สามารถวัดได้ต่ำถึง 14 ppb ในเวลาน้อยกว่า 3 นาทีและเก็บระบบได้นาน 2 สัปดาห์

Hayatsu, et al. (2000) ศึกษาผลของ burkhlocleria สายพันธุ์ NF100 ในการย่อยสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกนโนฟอสเฟต พบว่า แบคทีเรียชนิดนี้ใช้ OPs เป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้เวลาในการย่อย fenitrothion ได้ในเวลาเพียง 3 ชั่วโมง

Richard, et al. (2000) สกัดเอนไซม์จาก *E.coli* ที่มีการดัดต่อเป็นแบบ CBD-OPH ใช้การตรึงเอนไซม์ opd บน cellulose วิธีนี้ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ใกล้เคียงกับเอนไซม์บริสุทธิ์มาก เก็บไว้ 45 วัน ยังคงมีการทำงานถึง 85 %

Sacks, et al. (2000) ตรึงเอนไซม์ parathion hydrolase จาก *pseudomonas diminuta* บน screen print electrode วัดกระแส anodic ที่ 0.85 โวลต์ ตรวจวัด parathion ในตัวอย่างได้ไม่ได้นัก ต้องใช้ pluse technique 0.7 V 2 วินาที และ 0.85 V 1 วินาที สามารถวัด parathion ได้ ต่ำสุด 1ng

Wu, et al. (2002) ตรึงเอนไซม์ opd จากจุลินทรีย์ที่มีการติดต่อยีนบน pack column เพื่อให้เป็น reactor ในการย่อย paraoxon และตรวจวัดอัตราการย่อยที่เกิดขึ้นด้วยวิธี green fluorescent protein วิธีการนี้เป็นการวัดปริมาณเอนไซม์โดยไม่ต้องใช้ substrates แต่ใช้ความรู้เรื่องยีน ในการหาการทำงานของเอนไซม์แทน ซึ่งได้ผลเป็นที่น่าสนใจ

Zhongli, et al. (2001) ติดต่อยีน opd ใน *Plesiomonas* sp. สายพันธุ์ M6 มาย่อยสลาย MP ใช้เวลาในการย่อย MP น้อยกว่า 15 นาที

O' Brien, et al. (2001) หาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase (AP) กับ phosphodiesterase พบว่า AP มี active site ที่มี Zn^{2+} สองอะตอมในโมเลกุลทนความร้อนได้ไม่น้อยกว่า $80^{\circ}C$ การทำงานของเอนไซม์ เทียบเท่า phosphodiesterase ทุกอย่าง

Mulchandani, et al. (2001) ตรึงเซลล์ *Moraxella* sp. บนข้าวคาร์บอนเพสต์เพื่อวิเคราะห์ Ops ด้วยวิธีแอมเพอโร พบว่าใช้เซลล์ 10 mg ต่อ คาร์บอนเพสต์ 100 mg ในบัฟเฟอร์ pH 8.5 ศักย์ไฟฟ้า 0.9 โวลต์ สามารถวัด paraoxon ได้ต่ำที่สุด $0.2 \mu M$ MP $1 \mu M$ เก็บที่ $4^{\circ}C$ ได้ 45 วัน

Kang, et al. (2002) ใช้ bacteria hemoglobin เพื่อช่วยในการติดต่อยีนใน *E.Coli* เพื่อเพิ่มการผลิต OPH ให้มากขึ้นวิธีการนี้ทำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ OPH ได้มากขึ้น

Shimazu, et al. (2002) ใช้ Thermally Triggered สกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์และตรึงเอนไซม์บน elastin สามารถสกัดเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง และการตรึงเอนไซม์วิธีการนี้ จะเก็บเอนไซม์ที่ยังคงแอกทิวิตี 100 % ได้ไม่น้อยกว่า 21 วัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Denver instrument company)
2. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave, KT 30 LD)
3. เครื่องเหวี่ยง (Model Universal 16, Hettich Zentrifugen)
4. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (Ultrasonic, Eltrosonic type 0.7 profi, Kubota)
5. ชุด Flow-through thin-layer electrochemical cell (Model CC5 Bioanalytical system Inc.)
6. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow, Model Microflow Laminar flow Cabinet ,MDH)
7. ไมโครปิเปตขนาด 10-100 μL , 100-1000 μL
8. Peristaltic pump ของเครื่องเก็บตัวอย่าง (Isco)
9. เครื่อง pH-meter (Model Russel RL 150, Russel Inc.)
10. เครื่อง Potentiostat (Model PGSTAT 20, Autolab, Ecochemie)
11. เครื่อง UV-Visible spectrophotometer (Model UV 1601, Shimadzu)
12. เครื่อง VA stand 663 voltammetric analyzer (Metrohm, Herisau, Switzerland)

3.2 สารเคมี

1. p – Nitrophenol AR grade (Merck)
2. ฟู้น (Commercial grade)
3. Ammonium Sulfate AR grade (Ajax chemical)
4. Bovine Serum Albumin AR grade (Fluka)
5. Coomassie Brilliant Blue G-250 AR grade (Fluka)
6. Ethanol (Comercial grade)
7. Ethanol Absolute AR grade (Merck)
8. Ethylene Imine Polymer Solution AR grade (Fluka)
9. Graphite Powder (Merk)
10. Glutaraldehyde 50 % Molecular Biology grade (Research organic)
11. Magnesium Chloride (Ajax chemical)
12. Methanol (Comercial grade)
13. Methyl Parathion 98 % (Byer)
14. Methyl Parathion Folidol E 605 M50 50 % (Commercial grade)
15. Parafin Oil (Merk)
16. di-Sodium Hydrogen Orthophosphate Dihydrate AR grade(Ajax chemical)
17. Sodium Phosphate Monobasis AR grade (Ajax chemical)
18. Sodium Chloride AR grade (Fine chem)
19. Sodium Dihydrogen Orthophosphate AR grade (Ajax chemical)
20. Tris (hydroxy methyl) Amino Methane Molecular Biology Grade (Research organic)
21. Tris (hydroxy methyl) Amino Methane hydrochloric acid Molecular Biology Grade
(Research organic)
22. Typtone (Difco)
22. Yeast extract (Fluka)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 ทดสอบการย่อยสลาย MP ของเชื้อ *Burkholderia cepacia*

1. เชื้อเชื้อ *Burkholderia cepacia* 1 โคโลนีเชื้อลงในอาหาร LB 20 mL บ่ม 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง
2. เตรียมอาหาร LB และ LB+ MP 50 ppm แข็ง 20 mL ในจานเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้ว กลวงลงไฟเจาะหลุม 4 หลุม
3. ปิเปต เซลล์ในข้อที่ 1 ไป 20 μ L ลงในหลุม ทั้ง 4 หลุม
4. สังเกตผลของการเจริญของเชื้อชนิดนี้ในอาหาร LB และ LB+ MP 50 ppm

3.3.2 วัดการเจริญเติบโตของเซลล์ *Burkholderia cepacia* ในอาหาร LB

1. เชื้อเชื้อ 1 โคโลนีลงในอาหารที่มี MP อยู่ 10 ppm 5 mL ในขวดรูปกรวย 25 mL บ่ม ไว้บนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
2. ปิเปต 1 mL ของเชื้อที่บ่มไว้ 24 ชั่วโมง ใส่ในอาหารจำนวน 98 mL เติม 1 mL ของ MP 1,000 ppm ในขวดรูปกรวย 125 mL เตรียม 3 ขวด หลังจากนั้น ปิเปต 1 mL ของ MP 1,000 ppm ลงในอาหาร 99 mL ในขวดรูปกรวยขนาด 125 mL 1 ขวดสำหรับเป็น blank บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. นำเซลล์ในอาหารที่บ่มไว้มาวัดการดูดกลืนแสงของ ที่เวลา 0,3,6,9,12,15,18,21,24 ที่ ความยาวคลื่น 600 nm
4. สร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเวลา

3.3.3 การแยกเอนไซม์

1. เชื้อเชื้อ 1 โคโลนีในอาหาร 20 mL บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 13-15 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อ 3 mL ลงในอาหาร LB 297 mL ที่มี MP อยู่ 10 ppm บ่ม 13 ชั่วโมง
3. นำอาหารหลังการบ่มไปที่ 7,500 รอบต่อนาที 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C
4. ล้างเซลล์ด้วยน้ำ 2 ครั้ง แล้วใส่สารละลายสำหรับทำให้เซลล์แตก นำไปจุ่มน้ำ 30°C 10 นาที น้ำแข็ง 0°C 15 นาที (4 รอบ) หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ 7,500 รอบต่อนาที 10 นาที
5. นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
6. ละลายตะกอนด้วยทริสไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ 0.1 M pH 8.0 เก็บที่ 4 °C
7. หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford และแอกทิวิตีของเอนไซม์

* การทดลอง 3.3.1 - 3.3.3 ทำการทดลองโดยอาศัยเทคนิคการปราศจากเชื้อทั้งสิ้น

3.3.4 หาพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดแอกทิวิตีของเอนไซม์

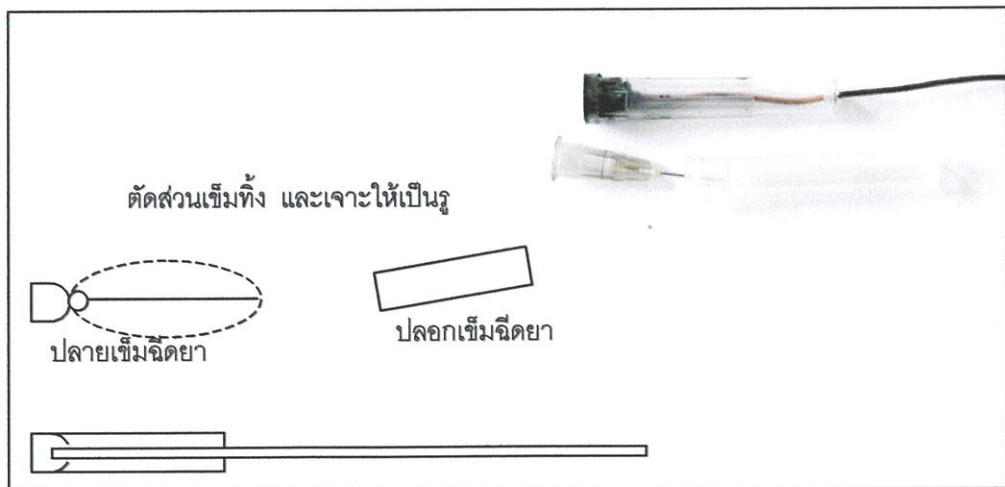
1. เตรียมทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 7.0, 8.0, 9.0
2. เตรียม MP 50 ppm ที่ละลายในทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 7.0, 8.0, 9.0
3. ปิเปต ทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 7.0 ลงในคิวเวต 3000 μL ทั้ง 2 คิวเวต
4. เติม MP 50 ppm ในทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 7.0 50 μL ทั้ง 2 คิวเวต
5. กด Autozero ที่เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
6. เติมเอนไซม์ที่แยกได้ 50 μL ลงในคิวเวตที่เป็นตัวอย่าง เติมทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 7.0 50 μL ในคิวเวตอ้างอิง
7. ทิ้งไว้ 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้น
8. สร้างกราฟมาตรฐานการวัด PNP นำค่าที่ได้ในข้อ 7 มาคำนวณหาความเข้มข้นของ PNP ที่เกิดขึ้นคำนวณหาค่าแอกทิวิตีเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดดังภาคผนวก ข.2
9. ทำการทดลองดังข้อ 3-8 กับ MP ในทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 8.0, 9.0

3.3.5 หาความเสถียรภาพของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm ของเอนไซม์ที่สกัดได้ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับ 3-7 ในหัวข้อ 3.3.4 ใน pH ที่เหมาะสมทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

3.3.6 การจัดอุปกรณ์และสร้างขั้วไฟฟ้าในระบบแบทช์

3.3.6.1 การสร้างขั้วในระบบแบทช์



รูปที่ 3.1 การสร้างขั้วทำงานในระบบแบทช์

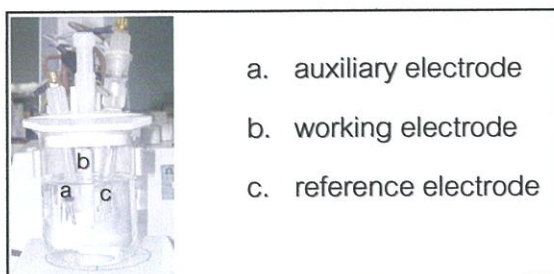
1. นำปลายเข็มฉีดยาพร้อมปลอกขนาด 1 mL มาหักเข็มออก ใช้ลวดลนไฟเจาะช่องเข็มให้มีขนาดใหญ่ขึ้น
2. สอดลวดทองแดงยาว 20 cm แทนที่เข็ม หยอดกาวเพื่อไม่ให้ลวดเลื่อนหลุด
3. สวมเข็มเข้าไปในปลอกเข็ม ตัดส่วนที่เกินจากปลอกเข็มทิ้ง ใช้กาวอีพอกซีเชื่อมระหว่างปลอกเข็มและปลายเข็ม
4. ขัดผิวหน้าด้วยกระดาษทราย

3.3.6.2 การจัดอุปกรณ์ในระบบแบบทซ์



รูปที่ 3.2 การจัดอุปกรณ์ในระบบแบบทซ์

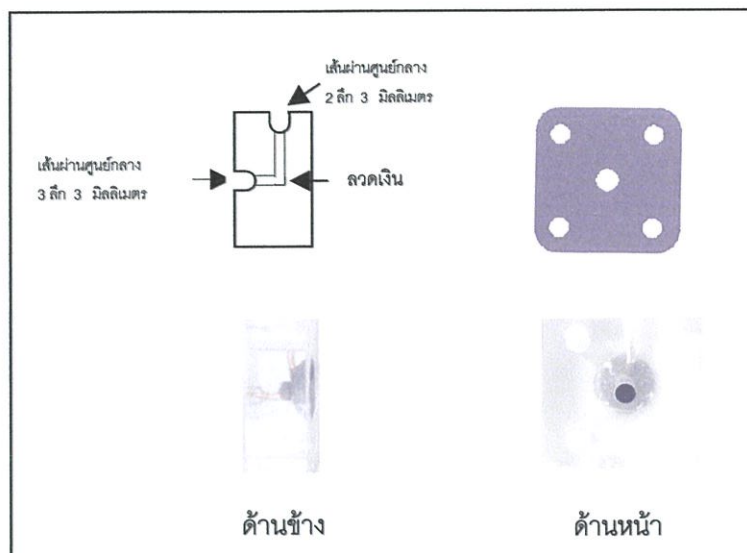
1. เครื่อง 663 VA stand มีขั้วอ้างอิงเป็น Ag/AgCl ขั้วไฟฟ้าช่วย Pt ขั้วทำงานเป็นคาร์บอนเพลท์
2. เซลล์สำหรับใส่สารตัวอย่างแล้วแต่ปริมาตรสารที่ใช้ ในการทดลองนี้ใช้เซลล์ปริมาตร 30 mL
3. เครื่อง Potentiostat (Autolab PG stat 20) ป้อนและควบคุมศักย์ไฟฟ้า
4. คอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรม GPEs ควบคุมการทำงานของ PG stat 20 และแปลผลข้อมูล



รูปที่ 3.3 การจัดวางขั้วในระบบแบบทซ์

3.3.7 การจัดอุปกรณ์และสร้างขั้วในระบบการไหลต่อเนื่อง

3.3.7.1 การสร้างขั้วในระบบการไหลต่อเนื่อง



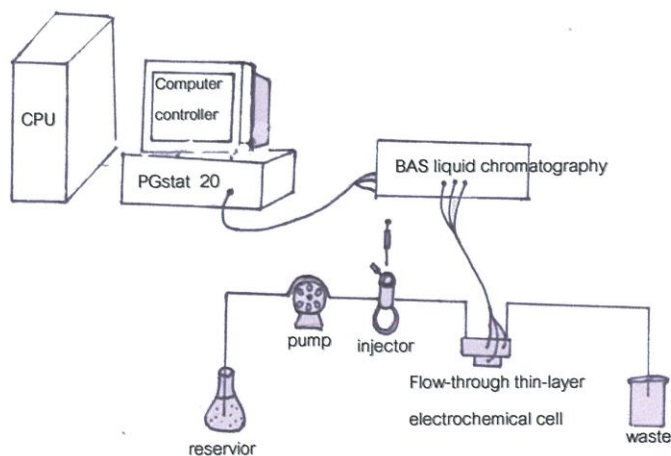
รูปที่ 3.4 การสร้างขั้วทำงานในระบบการไหลต่อเนื่อง

1. นำแผ่นอะครีลิกขนาด $2.5 \times 2.5 \times 1$ cm มาเจาะรู 4 รู เส้นผ่านศูนย์กลางของรูเท่ากับ 3.5 mm ดังภาพที่ 3.4

2. เจาะรูตรงกลางสำหรับใส่สารเคมีที่ใช้เป็นขั้วทำงานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 mm ด้านบนเจาะรูสำหรับเชื่อมขั้วทำงานกับสายต่อของเครื่อง BAS liquid chromatography

3. ใช้ลวดเงินหรือลวดทองแดงเชื่อมรอยต่อของรูทั้งสองดังภาพที่ 3.4

3.3.7.2 การจัดเครื่องมือในระบบการไหลต่อเนื่อง

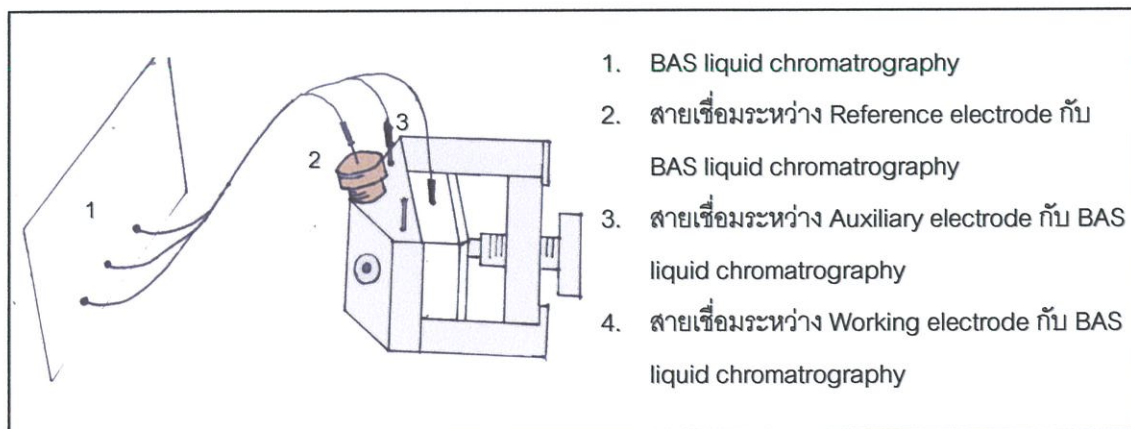


รูปที่ 3.5 แบบจำลองเครื่องมือในระบบการไหลต่อเนื่อง

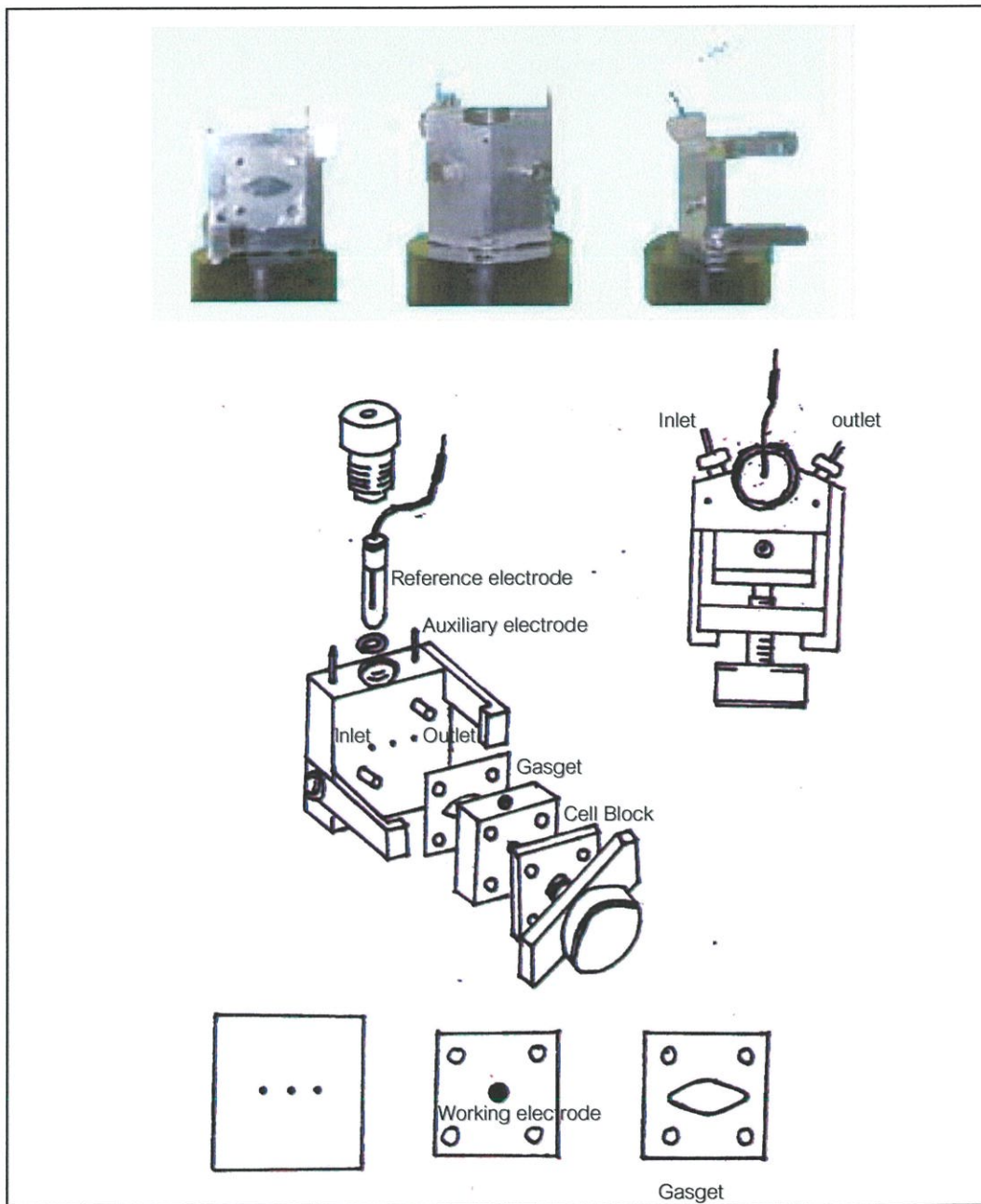


รูปที่ 3.6 การจัดเครื่องมือในระบบการไหลต่อเนื่อง

1. ภาชนะใส่สารตัวอย่าง
2. ปุ่ม
3. อุปกรณ์ฉีดสารตัวอย่าง
4. Flow-through thin-layer electrochemical cell
5. ขวดใส่ waste
6. BAS liquid chromatography ทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง Flow-through thin-layer electrochemical cell กับ Potentiostat
7. สายเชื่อมระหว่าง BAS liquid chromatography กับ Potentiostat



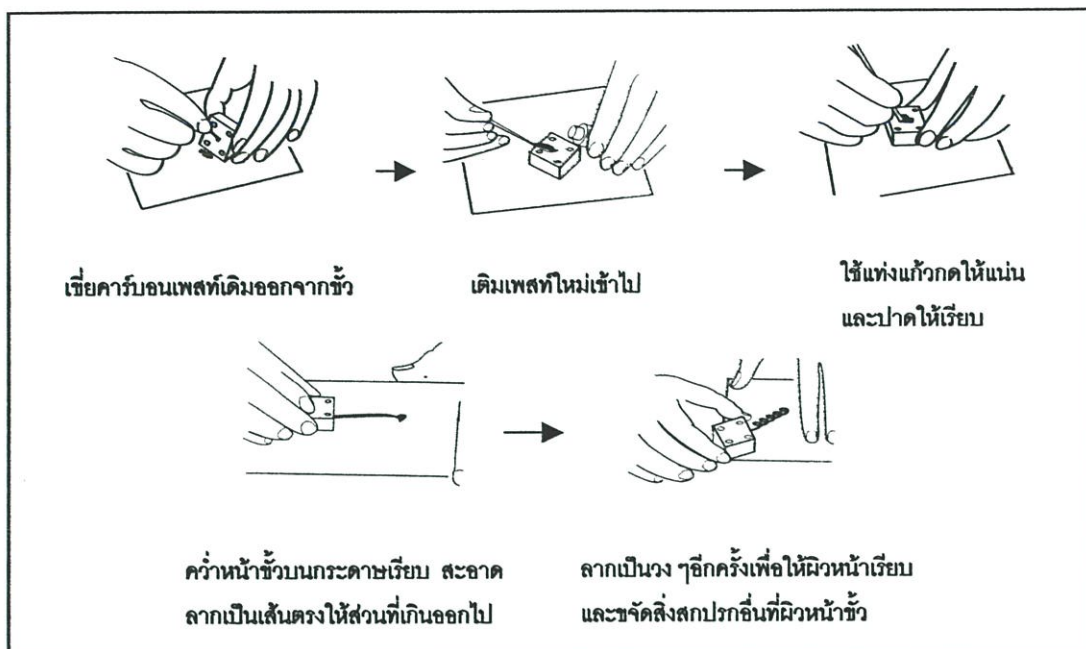
รูปที่ 3.7 การเชื่อม Flow-through thin-layer electrochemical cell กับ BAS liquid chromatography



รูปที่ 3.8 Flow-through thin-layer electrochemical cell และ แบบจำลองการประกอบส่วนต่างๆ ของ Flow-through thin-layer electrochemical cell

Flow-through thin-layer electrochemical cell ทำจาก Stainless steel มี Pt เป็น Auxiliary electrode Ag/AgCl เป็น Reference electrode สารตัวอย่างจะมาจากทางช่องน้ำเข้า แล้วเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าของ Working electrode (ตรงกลาง) หลังจากนั้นจะผ่านออกไปที่ทางน้ำออก โดยมี gasjet เป็นตัวบังคับทิศทางการไหลของสาร

3.3.8 การบรรจุคาร์บอนเพสต์เพื่อเป็นขั้วทำงาน



รูปที่ 3.9 การบรรจุและขัดผิวหน้าขั้วก่อนใช้งาน

การบรรจุคาร์บอนเพสต์เพื่อใช้เป็นขั้วทำงานทั้งในระบบแบบทซ์และระบบการไหลต่อเนื่องมีการบรรจุเหมือนกันดังรูปที่ 3.9 เพียงแต่ในระบบแบบทซ์บรรจุในเข็มฉีดยาที่สร้างขึ้น ระบบการไหลต่อเนื่องบรรจุในอะครีลิกที่สร้างขึ้น การขัดผิวหน้าขั้วก่อนใช้งานก็ทำเช่นเดียวกันดังรูปที่ 3.9

3.3.9 การเช็คสภาพขั้ว

3.3.9.1 ในระบบแบบทซ์

1. เติมทริสไฮโดรคลอไรด์ 0.1 M pH 8.0 30 mL ลงในเซลล์สำหรับใส่ตัวอย่าง
2. จุ่มขั้วคาร์บอนเพสต์ที่สร้างขึ้นในเซลล์สำหรับใส่ตัวอย่างใช้วิธีไซคลิกโวลแทมเมทรีสแกนศักย์ไฟฟ้าด้วยในช่วง 0.5-1.25 V สังเกตกระแสที่เกิดขึ้น

3.3.9.2 ในระบบการไหลต่อเนื่อง

1. ไปที่เมนูเลือก Mode Utilities เลือก Check cell เครื่องจะเช็คสภาพและการเชื่อมต่อของขั้ว
2. สังเกตสัญญาณที่เกิดขึ้น หากสัญญาณติดลบ แสดงว่าผิวหน้าหรือการเชื่อมต่อมีปัญหา

3.3.10 การหาคักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการวัด PNP ด้วยระบบแบบทซ์

3.3.10.1 หาอัตราส่วนของผงแกรไฟต์และพาราฟินออยล์ที่เหมาะสมในการวัด

PNP

1. เตรียมผงแกรไฟต์และ พาราฟินออยล์ ในอัตราส่วนต่างๆเป็นชิ้นทำงาน

| อัตราส่วนผงแกรไฟต์ (mg) : พาราฟินออยล์ (mg) | ปริมาณผงแกรไฟต์ (mg) | พาราฟินออยล์ (mg) |
|--|----------------------|-------------------|
| 9:1 | 100 | 11.11 |
| 8:2 | 100 | 25.00 |
| 7:3 | 100 | 42.86 |
| 6:4 | 100 | 66.67 |
| 5:5 | 100 | 100.00 |
| 4:6 | 90 | 135.00 |
| 3:7 | 90 | 186.66 |
| 2:8 | 80 | 100.00 |
| 1:9 | 50 | 200.00 |

2. จุ่มขั้วคาร์บอนเพลทที่อัตราส่วนต่างๆ ลงในเซลล์ที่มี PNP 10 ppm ในบัฟเฟอร์

Tris-HCl 0.1 M pH 8

3. ใช้วิธีไซคลิกโวลแทมเมทรีสแกนคักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ 0.5-1.25 V Scan rate 0.1 V/s

Step potential 0.001 V

4. สังเกตกระแสออกซิเดชัน-รีดักชัน ที่เกิดขึ้น

3.3.10.2 การหาคักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการวัด PNP

1. ใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมในข้อ 3.3.10.1 จุ่มในเซลล์ที่มี PNP 10 ppm ในบัฟเฟอร์

Tris-HCl 0.1 M pH 8

2. ใช้วิธีไซคลิกโวลแทมเมทรีสแกนคักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ 0.5-1.25 V Scan rate 0.1 V/s

Step potential 0.001 V

3. บันทึกคักย์ไฟฟ้าที่เกิดกระแสออกซิเดชันหรือรีดักชัน

3.3.11 หาสภาวะที่เหมาะสมในการวัด PNP ด้วยระบบการไหลต่อเนื่อง

3.3.11.1 หาอัตราเร็วที่เหมาะสมของตัวพา

1. ใช้อัตราส่วนของคาร์บอนเพสต์ที่เหมาะสม ใน 3.3.10.1 เป็นขั้วทำงานจัด
อุปกรณ์ดัง 3.3.7.2

2. ตรวจวัด PNP ดังสภาวะต่อไปนี้

| | สภาวะที่ใช้ |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| ศักย์ไฟฟ้า | ที่เหมาะสมใน 3.3.10.2 |
| ตัวพาทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ 0.1M | pH 8.0 |
| ปริมาตรสารตัวอย่าง | 30 μ L |
| สารตัวอย่าง | PNP 10, 20, 40, 60, 80, 100 ppm |
| อัตราการไหลของตัวพา | 0.3, 0.25, 0.20, 0.15 mL/min |

3. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นที่อัตราการไหลต่างๆ

4. สังเกตผลของความชันและช่วงความเป็นเส้นตรงที่ตรวจวัดได้

3.3.11.2 หาพีเอชที่เหมาะสมของตัวพา

1. ใช้อัตราส่วนของคาร์บอนเพสต์ที่เหมาะสม ใน 3.3.10.1 เป็นขั้วทำงานจัด
อุปกรณ์ดัง 3.3.7.2

2. ตรวจวัด PNP ดังสภาวะต่อไปนี้

| | สภาวะที่ใช้ |
|--|---------------------------------|
| ศักย์ไฟฟ้า | ที่เหมาะสมใน 3.3.10.2 |
| ปริมาตรสารตัวอย่าง | 30 μ L |
| สารตัวอย่าง | PNP 10, 20, 40, 60, 80, 100 ppm |
| อัตราการไหลของตัวพา | ที่เหมาะสมใน 3.3.11.1 |
| ตัวพาทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ 0.1M | pH 7.0, 8.0, 9.0 |

3. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นที่อัตราการไหลต่างๆ

4. สังเกตผลของความชันและช่วงความเป็นเส้นตรงที่ตรวจวัดได้

3.3.11.3 หาปริมาณของสารตัวอย่างที่เหมาะสม

1. ใช้อัตราส่วนของคาร์บอนเพสต์ที่เหมาะสม ใน 3.3.10.1 เป็นตัวทำงานจัด

อุปกรณ์ดัง 3.3.7.2

2. ตรวจวัด PNP ดังสภาวะต่อไปนี้

| | สภาวะที่ใช้ |
|------------------------------------|---------------------------------|
| ศักย์ไฟฟ้า | ที่เหมาะสมใน 3.3.10.2 |
| สารตัวอย่าง | PNP 10, 20, 40, 60, 80, 100 ppm |
| อัตราการไหลของตัวพา | ที่เหมาะสมใน 3.3.11.1 |
| ตัวพาทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.1M | ที่เหมาะสมใน 3.3.11.2 |
| ปริมาตรสารตัวอย่าง | 10, 20, 30 μ L |

3. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นที่อัตราการไหลต่างๆ

4. สังเกตผลของความชันและช่วงความเป็นเส้นตรงที่ตรวจวัดได้

3.3.12 ศึกษาการตรวจวัด MP ด้วยขั้วเอนไซม์ตรึงในระบบการไหลต่อเนื่อง

3.3.12.1 การตรึงเอนไซม์บนขั้วคาร์บอนเพสต์

1. หยอด PEI 0.5 % 50 μ L บนคาร์บอนเพสต์ที่เหมาะสมใน 3.3.10.1 ทิ้งให้แห้งในเดซิเคเตอร์ จนแห้งสนิท

2. ล้างด้วยน้ำกลั่น

3. หยอดสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5 % ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.0 50 μ L บนขั้ว ทิ้งให้แห้งสนิทในเดซิเคเตอร์

4. ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.0

5. เติมเอนไซม์ 50 μ L บนขั้ว ทิ้งให้แห้งสนิทในเดซิเคเตอร์

6. ล้างด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C จนกว่าจะใช้งาน

3.3.12.2 ตรวจวัด MP ด้วยสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด PNP และเปรียบเทียบกับการวัด PNP ด้วยขั้วชนิดต่างๆ

1. ตรวจวัด PNP โดยใช้ขั้วคาร์บอนเพสต์ สภาวะดังการทดลองที่ 3.3.11

2. ตรวจวัด PNP โดยขั้วที่มีการปรับสภาพขั้ว ปรับสภาพขั้วดัง 3.3.12.1 ตั้งแต่ข้อที่ 1-4 เรียกขั้วนี้ว่าเป็น Modified electrode สภาวะการทดลองดังข้อ 2 ของการทดลองที่ 3.3.11

3. ตรวจวัด MP โดยใช้หัวคาร์บอนเพสท์ สภาวะดังการทดลองที่ 3.3.11

4. ตรวจวัด MP โดยใช้หัวเอนไซม์ตรีง ตรีงเอนไซม์บนหัวดัง 3.3.12.1 สภาวะการทดลองดังข้อ 2 ของการทดลองที่ 3.3.11

5. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ที่พิกกับความเข้มข้นของสารในการตรวจวัดข้อ 1-4

6. เปรียบเทียบความชันและช่วงความเป็นเส้นตรงของ การตรวจวัดข้อ 1-4

3.3.13 ศึกษาสมบัติของหัวเอนไซม์ตรีงในการตรวจวัด MP ด้วยระบบการไหลต่อเนื่อง

3.3.13.1 การตอบสนองเชิงเส้น (linear range)

ทำการทดลองดังข้อ 4 ในการทดลอง 3.3.12.2 มาสร้างกราฟมาตรฐานของพื้นที่พิกและความเข้มข้นของ MP เพิ่มความเข้มข้นของ MP ไปจนกระทั่งกราฟที่ได้มีแนวโน้มไม่เป็นเส้นตรง ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงเป็นเส้นตรง (ไม่โค้ง) เป็นค่าการตอบสนองเชิงเส้น

3.3.13.2 สภาพไวของหัวเอนไซม์ตรีง (Sensitivity)

นำช่วงการตอบสนองเชิงเส้นในข้อ 3.3.13.1 มาสร้างกราฟ linear regression หาความชันจากกราฟดังกล่าว ความชันที่ได้เป็นสภาพไวในการตรวจวัด

3.3.13.3 ขีดจำกัดในการตรวจวัด (Detection limit)

หาพื้นที่พิกในสารละลายแบลงค์ ที่เวลา 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 วินาที อย่างละ 3 พิก นำพื้นที่พิกที่ได้มาหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน นำส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้ คูณ 3 (ที่ความเชื่อมั่น 95 %) ค่าที่ได้จากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานคูณสามไปแทนในสมการเส้นตรงในข้อ 3.3.13.2 จะได้ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

3.3.13.4 อายุการใช้งาน (life time)

1. อายุการใช้งานใน 1 วัน ตรวจวัด MP 60 ppm ด้วยหัวเอนไซม์ตรีง 3 ซ้ำ ปิดเครื่องแล้วเปิดเครื่องใหม่ ตรวจวัด MP 60 ppm ด้วยหัวเอนไซม์ตรีง 3 ซ้ำอีกครั้ง นำไปสร้างกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยพื้นที่พิกกับจำนวนครั้งในการเปิด-ปิดเครื่อง ทำเช่นนี้เรื่อยๆ จนพื้นที่พิกลดต่ำลงประมาณ 50 % บันทึกจำนวนครั้งที่เปิดเครื่องแล้วทำให้กระแสลดลงต่ำกว่า 50 %

2. อายุการใช้งาน 1 ครั้งในเวลา 7 วัน เปิดเครื่องตรวจวัด MP 60 ppm ด้วยหัวเอนไซม์ตรีง 3 ซ้ำ ปิดเครื่อง นำหัวเอนไซม์ตรีงเก็บในตู้เย็น 4 °C เปิดเครื่องและตรวจวัด MP 60 ppm ด้วยหัวเอนไซม์ตรีง 3 ซ้ำใหม่ในวันรุ่งขึ้น ทำเช่นนี้เป็นเวลา 7 วัน สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าเฉลี่ย

พื้นที่พื้กและจำนวนวันที่ทำการทดลอง ทำเช่นนี้เรื่อยๆ จนพื้นที่พื้กลดลงประมาณ 50 % บันทึกจำนวนวันที่ทำการทดลองแล้วกระแสลดลงต่ำกว่า 50 %

3.3.13.5 ความเป็นรีโพรดูซิบิลิตีในการตรึงไนโตรเจน (Reproducibility)

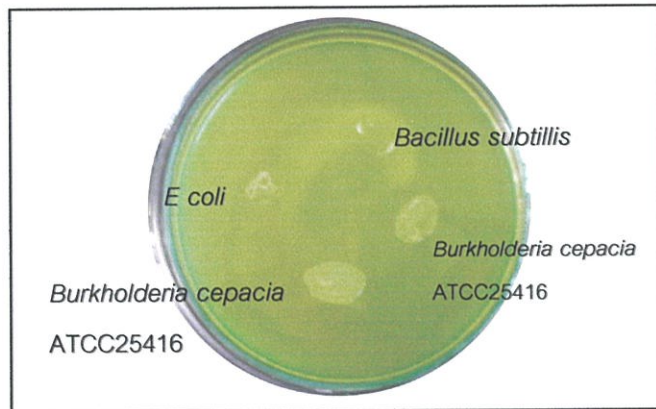
ตรึงไนโตรเจนใหม่ๆ บนข้าวคาร์บอนเพสต์ที่เหมาะสม 5 ครั้ง ฉีด MP 60 ppm 5 ครั้งต่อการตรึงไนโตรเจนบนข้าว 1 ครั้ง นำมาหาค่าเฉลี่ย นำค่าเฉลี่ยไปหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

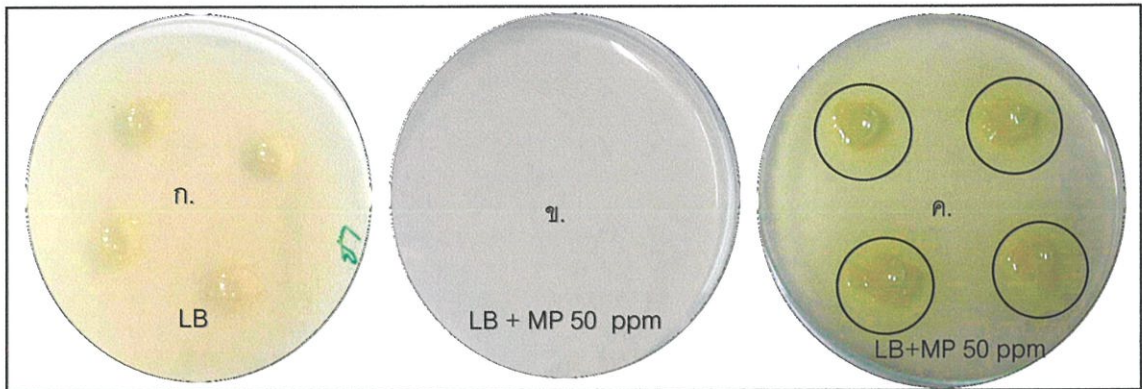
4.1 ทดสอบการย่อยสลาย MP ของเชื้อ *Burkholderia cepacia*

มีรายงานการทดลองมากมายพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดในดินสามารถย่อยสลาย MP ได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Keprasertsup, et al. (2001) มีรายงานว่าแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ที่แยกจากดินแถบตลิ่งชัน กรุงเทพฯ มีความสามารถในการย่อยสลาย MP ได้ดีกว่า *E.Coli* และ *Bacillus subtilis* งานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดสอบการรอดของแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* *E.Coli* และ *Burkholderia cepacia* ATCC25416 ในอาหาร LB ที่มีการเติมสารกำจัดแมลง MP 5,000 ppm (Folidol E605 M 50) เป็นเวลา 7 วันได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 การรอดของแบคทีเรีย 3 ชนิดในอาหาร LB ที่มีการเติมสารกำจัดแมลง MP 5,000 ppm (Folidol E605 M 50)

จากรูปที่ 4.1 พบว่า *Burkholderia cepacia* ATCC25416 สามารถเจริญเติบโตในอาหาร LB ที่มีการเติมสารกำจัดแมลง MP นี้ดีกว่าแบคทีเรียอีกสองชนิด แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนี้ต้องมีความสามารถในการนำ MP มาใช้เป็นอาหารได้ดีกว่าแบคทีเรียอีกสองชนิด สอดคล้องกับการทดลองของ Hayatsu, et al. (2000) พบว่า *Burkholderia* สายพันธุ์ NF 100 สามารถย่อยสลายสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตเพื่อใช้เป็นอาหารได้ ความสามารถการใช้สารกำจัดแมลงออร์แกโนฟอสเฟตเป็นอาหารของแบคทีเรียดังกล่าวจะทำโดยแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสออกมาเพื่อย่อยสารกำจัดแมลงเช่นถ้าย่อย MP แล้วผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะได้เป็น PNP ที่มีสีเหลือง ทำให้เราสามารถตรวจสอบต่อไปได้ว่า แบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ATCC25416 สามารถย่อย MP ได้หรือไม่โดยการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร LB ที่มี MP 50 ppm อยู่ แล้วสังเกตวงสีเหลืองของ PNP ที่เกิดขึ้น ได้ผลดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 วงสีเหลืองที่เกิดจากการย่อยสลาย MP เป็น PNP ของ *Burkholderia cepacia* ATCC25416

การทดสอบการย่อยสลายสารกำจัดแมลง MP ด้วยเซลล์ *Burkholderia cepacia* ATCC25416 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า

ก. การเลี้ยงเซลล์ *Burkholderia cepacia* ATCC25416 ในอาหาร LB ที่ไม่มีสารกำจัดแมลง MP 50 ppm พบว่าเชื้อเจริญเติบโตได้ดี และไม่มีวงสีเหลืองเกิดขึ้น

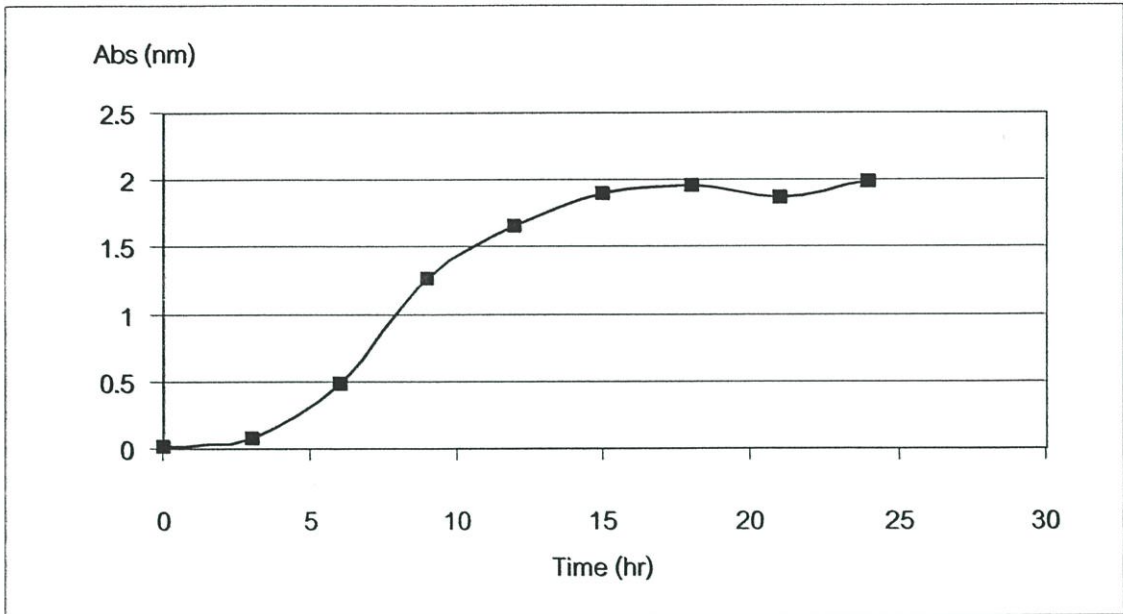
ข. อาหาร LB มีสารกำจัดแมลง MP 50 ppm ไม่มีเซลล์ *Burkholderia cepacia* ATCC25416 ไม่มีวงสีเหลืองเกิดขึ้น

ค. การเลี้ยงเซลล์ *Burkholderia cepacia* ATCC25416 ในอาหาร LB ที่มีสารกำจัดแมลง MP 50 ppm พบว่าเชื้อเจริญเติบโตได้ดี และมีวงสีเหลืองเกิดขึ้น

แสดงว่าเซลล์แบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ATCC25416 สามารถย่อยสารกำจัดแมลง MP เป็น PNP ได้ จึงวางสมมติฐานต่อไปได้ว่า เซลล์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสสำหรับย่อย MP เป็น PNP ได้

หากเราต้องการสกัดเอนไซม์ไฮโดรเลสจากเซลล์ดังกล่าวต้องเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาณมากและเซลล์ที่มีปริมาณมากนั้นต้องสามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสได้ด้วย ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษากการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวในอาหารชนิดนี้เสียก่อนดังการทดลองที่ 3.3.2 ได้ผลการทดลองดัง ข้อ 4.2

4.2 ผลการเจริญเติบโตของ *Burkholderia cepacia* ในอาหาร LB + MP 10 ppm



รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโตของเซลล์ *Burkholderia cepacia* ในอาหาร LB+MP 10 ppm ในเวลา 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *Burkholderia cepacia* ด้วยภาชนะ 125 mL อาหาร LB+MP10 ppm วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.3 พบว่า

ในช่วง 3 ชั่วโมงแรกเป็นช่วงค่าการดูดกลืนแสงมีค่าน้อยกราฟมีความชันต่ำ เพราะเซลล์อยู่ในช่วงที่มีการปรับตัว ไม่มีการแบ่งตัวและเพิ่มปริมาณเซลล์ ขณะเดียวกันกระบวนการเมตาโบลิซึมต่างๆ ภายในแต่ละเซลล์แตกต่างกันเพราะอยู่ในช่วงช่อมแซมส่วนที่สึกหรอ

ช่วง 3-15 ชั่วโมง เป็นช่วงที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้นจนสูงที่สุด ทำให้มีความชันที่สูงที่สุด เกิดจากเมื่อเซลล์ช่อมแซมส่วนที่สึกหรอแล้ว เซลล์จะแบ่งตัวเพิ่มปริมาณเซลล์ ช่วงนี้จึงมีการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ MP เป็นอาหาร

ช่วงหลังเวลา 15-24 ชั่วโมง เป็นช่วงที่ค่าการดูดกลืนแสงคงที่ เพราะไม่มีการแบ่งตัวของเซลล์อีก อันเนื่องมาจากระยะนี้อาหารที่เซลล์ใช้ในการเจริญเติบโตใกล้ที่จะหมด ขณะเดียวกันของเสียที่เซลล์ผลิตก็มากขึ้น ทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวและเจริญเติบโตต่อไปได้เซลล์จะตายในที่สุด

ดังนั้นเวลาประมาณ 13-15 ชั่วโมง เป็นเวลาที่ใช้ในการเก็บเซลล์เพราะเป็นช่วงที่มีปริมาณเซลล์สูงก็คือมีการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสเพื่อใช้ MP เป็นอาหารสูงนั่นเอง เมื่อหาเวลาเก็บเซลล์ได้แล้ว นำมาสกัดเอนไซม์แล้ว ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ต่อไป

4.3 พีเอชที่เหมาะสมในการหาแอกทิวิตี

การสกัดเอนไซม์จากเซลล์ *Burkholderia cepacia* เริ่มจากการเก็บเซลล์ในช่วง 13-15 ชั่วโมง โดยการปั่นเซลล์ที่ 7,000 รอบต่อนาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำ 2 ครั้ง เพื่อกำจัดอาหารที่ปนมากับเซลล์ นำเซลล์ที่ได้มาใส่สารละลายที่ทำให้เซลล์แตก หลังจากนั้นปั่นเศษเซลล์ทิ้ง เดิมแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน ละลายตะกอนที่ได้ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 7.0 แล้วจึงไปหาปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ (วิธีการทดลองดังภาคผนวก ข.2) ได้ผลการทดลองดังนี้

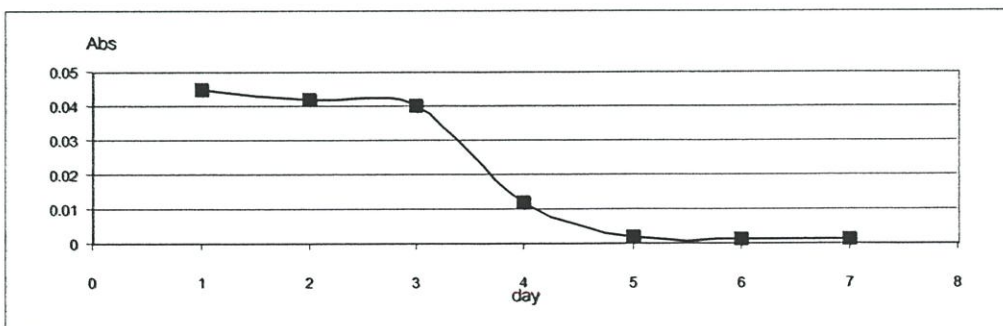
ตารางที่ 4.1 แอกทิวิตีของเอนไซม์ที่พีเอช ต่างๆ

| ผลการทดลอง | pH 7.0 | pH 8.0 | pH 9.0 |
|---|--------|--------|--------|
| ปริมาณโปรตีน (mg/mL) | 0.90 | 0.90 | 0.90 |
| Activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$) | 2.82 | 11.55 | 5.65 |
| Specific activity (unit/mg) | 3.10 | 12.80 | 6.26 |

จากการทดลองหาพีเอชที่เหมาะสม ในการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดได้ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M ในช่วง พีเอช 7.0 – 9.0 พบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดในช่วง pH 8.0

ปกติแล้วเอนไซม์จะเสียสภาพธรรมชาติจากการความร้อน ความเป็นกรด-ด่างที่ไม่เหมาะสมในการคงสภาพเอนไซม์หรือจากสารเคมีอื่นๆที่ทำให้เอนไซม์เปลี่ยนแปลงรูปร่างที่ไม่สามารถทำงานได้ ทุกครั้งในการผลิตเอนไซม์จึงควรรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ในสภาวะที่เก็บรักษาเอนไซม์นั้นๆ ดังการทดลองที่ 3.3.5

4.4 ความเสถียรภาพของเอนไซม์ในช่วง 1 สัปดาห์



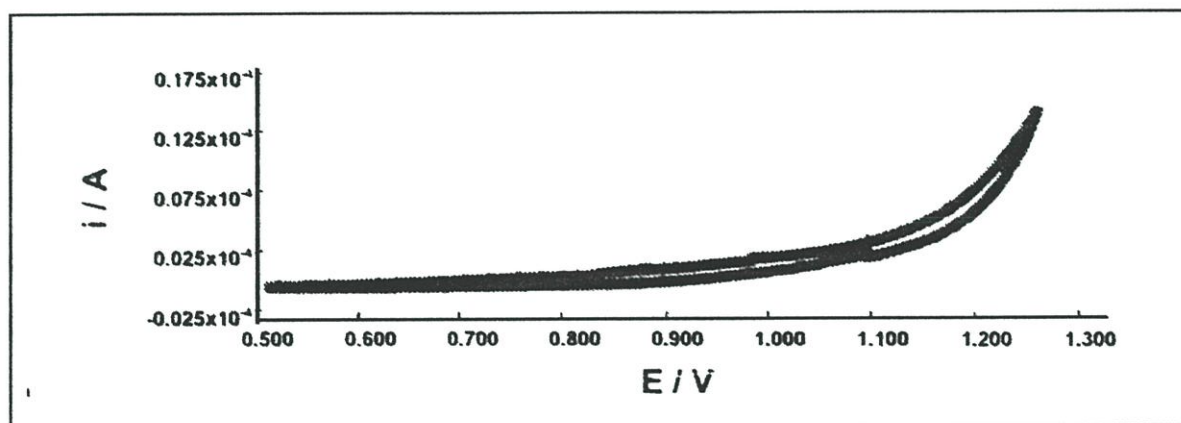
รูปที่ 4.4 ผลการทำงานของเอนไซม์ในเวลา 1 สัปดาห์

จากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นของ PNP ในเวลา 20 นาทีของแต่ละวันพบว่าการทำงานของเอนไซม์มีเสถียรภาพได้ใน 3 วัน ดังนั้นหากจะใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ดังกล่าวควรทำใน 3 วัน

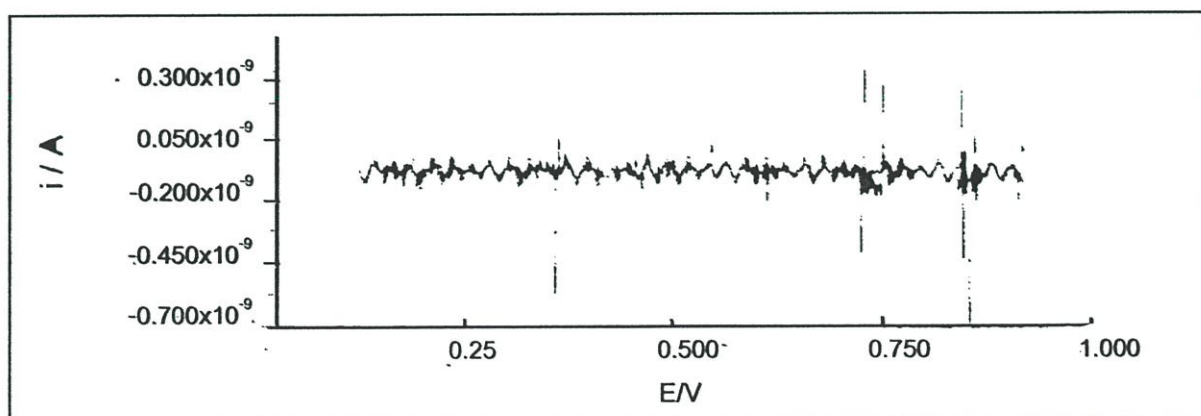
4.5 การเช็คสภาพขั้ว

4.5.1 ในระบบแบบทซ์

การเช็คสภาพขั้วคาร์บอนเพสต์ในระบบแบบทซ์ใช้วิธีการไซคลิกโวลแทมเมตรี โดยจุ่มขั้วเปล่าลงในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 30 mL ในเซลล์ระบบแบบทซ์ พบว่าขั้วที่มีประสิทธิภาพในการใช้งานเป็นดังภาพ 4.5 ขั้วไม่มีประสิทธิภาพเป็นดังภาพ 4.6



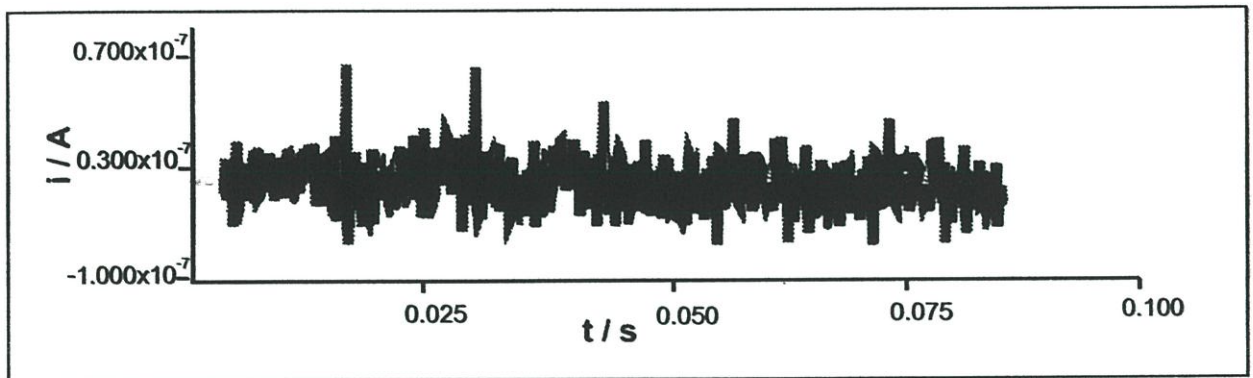
รูปที่ 4.5 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วคาร์บอนเพสต์ที่มีผิวหน้าขั้วเรียบนำสัญญาณได้ดี



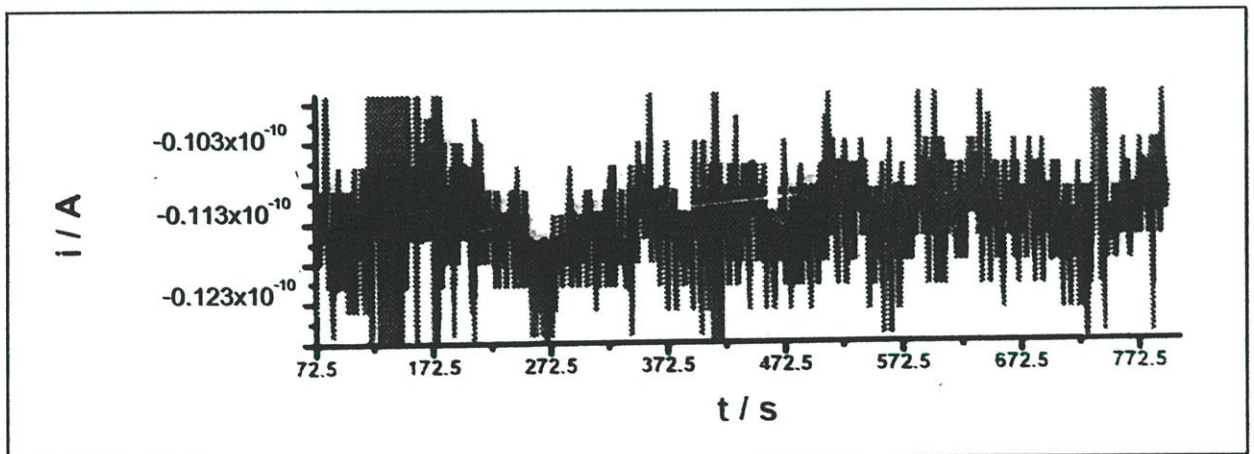
รูปที่ 4.6 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของขั้วคาร์บอนเพสต์ที่มีผิวหน้าขั้วไม่เรียบหรือนำสัญญาณได้ไม่ดี

4.5.2 ในระบบการไหลต่อเนื่อง

การเช็คสภาพขั้วในระบบการไหลต่อเนื่อง โดยการเข้าเมนูเลือก Mode Utilities เลือก Check cell หลังจากนั้นสังเกตสัญญาณที่เกิดขึ้นหากเกิดดังรูปที่ 4.7 แสดงว่าขั้วคาร์บอนเพสต์ที่ไม่มีปัญหา หากสัญญาณเกิดดังรูปที่ 4.8 แสดงว่าขั้วมีปัญหา



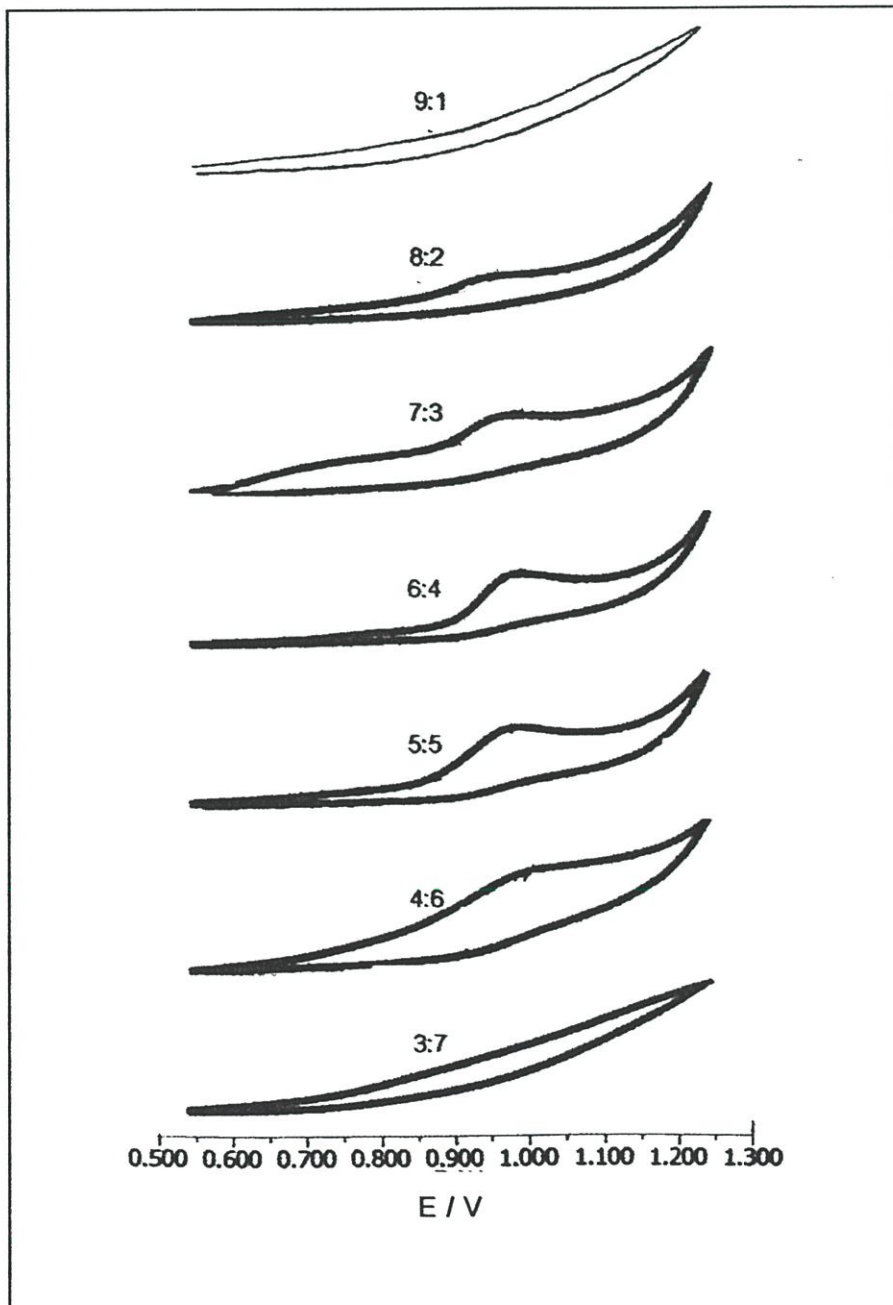
รูปที่ 4.7 กระแสที่เกิดขึ้นจากสภาพขั้วที่ดีในระบบการไหลต่อเนื่อง



รูปที่ 4.8 กระแสที่เกิดขึ้นจากสภาพขั้วที่มีปัญหาผิวหน้าไม่เรียบหรือตัวนำสัญญาณไม่ดี

4.6 ผลการหาอัตราส่วนผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ที่เหมาะสม

การหาผลของผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ที่เหมาะสมโดยการจุ่มคาร์บอนเพสต์ที่อัตราส่วนต่างๆ ลงใน Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 แล้วทำไซคลิกโวลแทมเมตรีที่ ในการวัด PNP 10 ppm ตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.500-1.250 V Scan rate 0.1 V/s Step potential 0.001 V ได้ผลดังรูปที่ 4.9

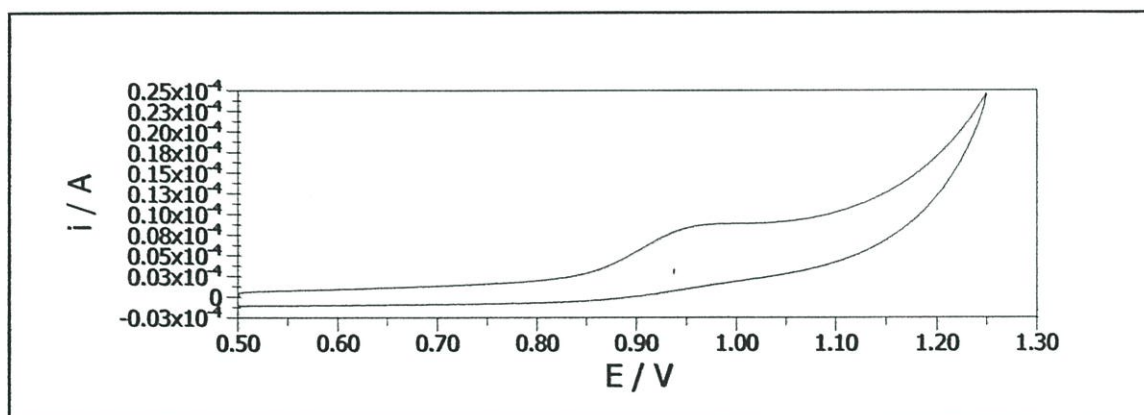


รูปที่ 4.9 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ PNP 10 ppm ที่อัตราส่วนผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ต่างๆ

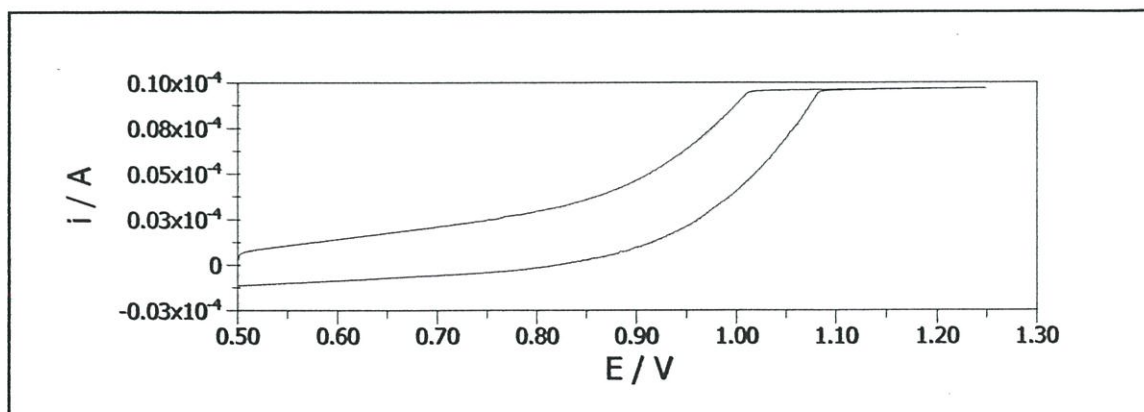
จากรูปที่ 4.9 พบว่าอัตราส่วนของผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์มีผลต่อกระแสที่เกิดขึ้นในการวิเคราะห์ PNP สังเกตจากความสูงของกระแสออกซิเดชันที่มีปริมาณไม่เท่ากัน จากการทดลองพบว่า ในอัตราส่วน 5 : 5 มีการส่งถ่ายอิเล็กตรอนได้ดีที่สุด เนื่องจากมีกระแสแอนอดิกสูงที่สุด จึงใช้อัตราส่วนดังกล่าวทำการทดลองต่อไป

4.7 ผลของศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการตรวจวัด PNP

เมื่อได้คาร์บอนเพสต์ที่ดีจากอัตราส่วนผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ที่เหมาะสมแล้ว บันทึกกระแสที่เกิดจากการออกซิเดชัน - รีดักชันของ PNP 10 ppm โดยการจุ่มขั้วคาร์บอนเพสต์ลงใน บัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 สังเกตกระแสตั้งแต่ศักย์ไฟฟ้าที่ 0.50 – 1.25 Scan rate 0.1 V/s Step potential 0.001 V เทียบกับขั้วอ้างอิง Ag/AgCl และขั้วไฟฟ้าช่วย Pt ได้ผลดังรูปที่ 4.10 และสังเกตกระแสออกซิชัน - รีดักชันของ MP ด้วยวิธีการเดียวกันได้ผลดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.10 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ PNP 10 ppm ใน Tris- HCl 0.1 M pH 8.0



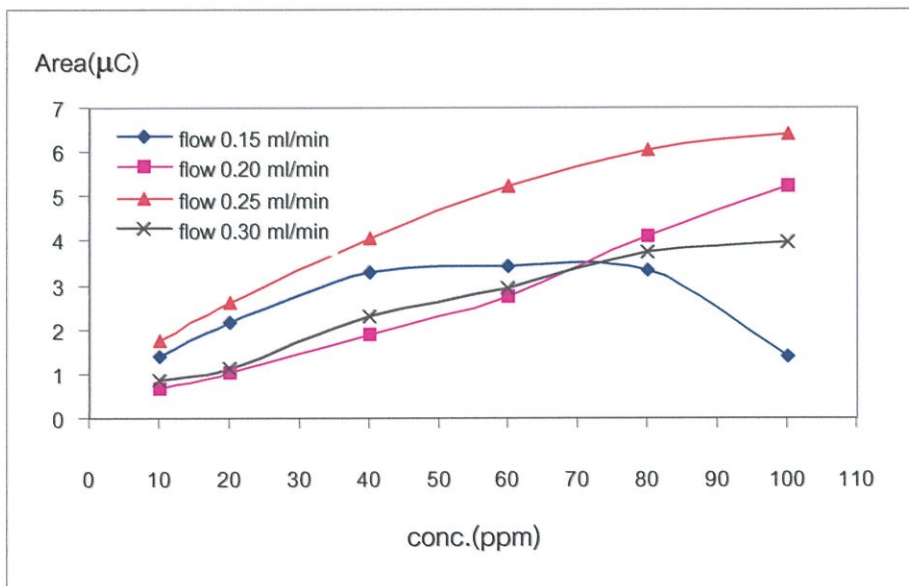
รูปที่ 4.11 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของ MP 10 ppm ใน Tris - HCl 0.1 M pH 8.0

จากรูปที่ 4.10 และ 4.11 พบว่า PNP สามารถเกิดกระแสแอโนดิกได้ที่ 0.95 V ในขณะที่ MP ไม่เกิดกระแสในช่วงศักย์ไฟฟ้าดังกล่าว การทดลองนี้จึงเลือกศักย์ไฟฟ้าที่ 0.95 V ทำการทดลองต่อไป

จากการศึกษาการวัด PNP ทางเคมีไฟฟ้าของ Ruana และ Urbe (1993) พบว่า การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลต้องทำความสะอาดผิวหน้าขั้วทุกครั้งก่อนวัด เพราะผลของปฏิกิริยาของสารฟีนอลจะทำให้เกิดการเกาะติดของสารที่ผิวหน้าขั้ว (Passivation) ทำให้กระแสในการวัดลดลง การทดลองนี้จึงศึกษาการวัด PNP ในระบบการไหลต่อเนื่องต่อไปเพื่อขจัดปัญหาดังกล่าวและเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการวิเคราะห์

4.8 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัด PNP ด้วยระบบการไหลต่อเนื่อง

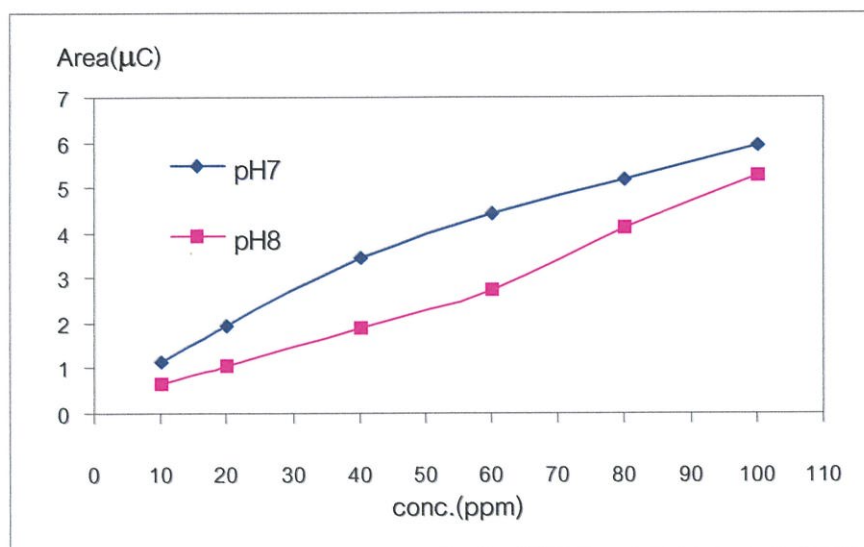
4.8.1 ผลของอัตราเร็วของตัวพา



รูปที่ 4.12 ผลของอัตราเร็วของตัวพาในการตรวจวัด PNP

จากรูปที่ 4.12 ในการตรวจวัด PNP โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L ตัวพา Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ในอัตราการไหลต่างๆ ใช้ขั้วคาร์บอนเพส ที่ในอัตราส่วนผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ (5 : 5) เทียบกับขั้วอ้างอิง Ag/AgCl มี Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย พบว่าที่ 0.15 mL/min ไม่เลือกเพราะการตอบสนองเชิงเส้นน้อย ที่อัตราการไหล 0.3 mL/min มีสภาพไว 0.0425 $R^2 = 0.989$ ซึ่งน้อยกว่าที่อัตราการไหล 0.25 และ 0.20 mL/min ส่วนสภาพไวและ R^2 ที่ 0.25 และ 0.20 mL/min มีค่าเป็น 0.0613, 0.986 และ 0.0506, 0.989 ตามลำดับ จะเห็นว่าที่ 0.25 mL/min มีสภาพไวสูงกว่าแต่ช่วง ความเป็นเส้นตรงและ R^2 น้อยกว่าที่ 0.2 mL/min การทดลองนี้จึงเลือกที่ 0.2 mL/min ทำการทดลองต่อไป

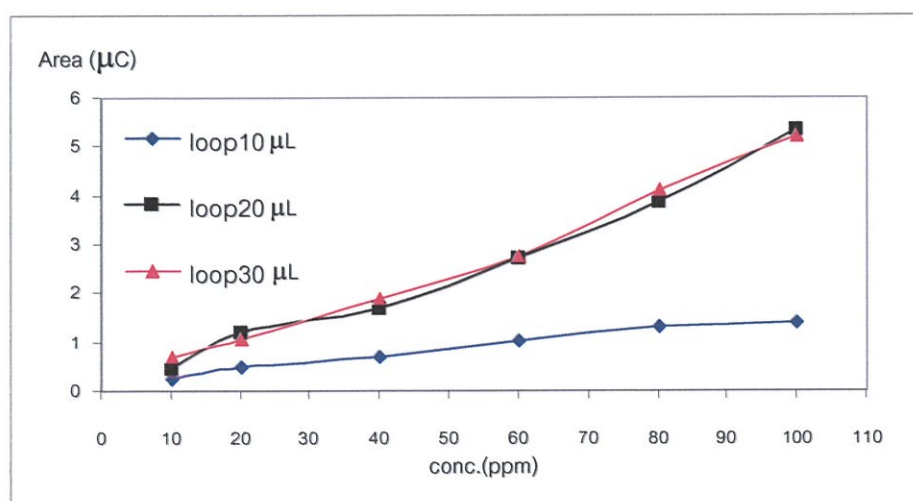
4.8.2 ผลของพีเอชของตัวพา



รูปที่ 4.13 ผลของพีเอชของตัวพา Tris-HCl 0.1 M ในการตรวจวัด PNP

จากรูปที่ 4.13 ในการตรวจวัด PNP ด้วยขั้วคาร์บอนเพสทีในอัตราส่วนผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ (5 : 5) เทียบกับขั้วอ้างอิง Ag/AgCl มี Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μL ที่อัตราการไหล 0.2 mL/min ตัวพา Tris-HCl 0.1 M pH 7.0, 8.0 และ 9.0 พบว่า ที่ pH 9.0 ไม่สามารถตรวจวัด PNP ได้ ในขณะที่สภาพไวและ R^2 ที่ pH 7.0 และ 8.0 เป็น 0.0527, 0.976 และ 0.0509, 0.989 ตามลำดับจะเห็นว่าสภาพไวที่พีเอชทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกัน แต่จากการทดลองหาพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 8.0 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือก Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ทำการทดลองต่อไป

4.8.3 ผลของปริมาตรสารตัวอย่าง



รูปที่ 4.14 ผลของปริมาตรสารตัวอย่างในการตรวจวัด PNP

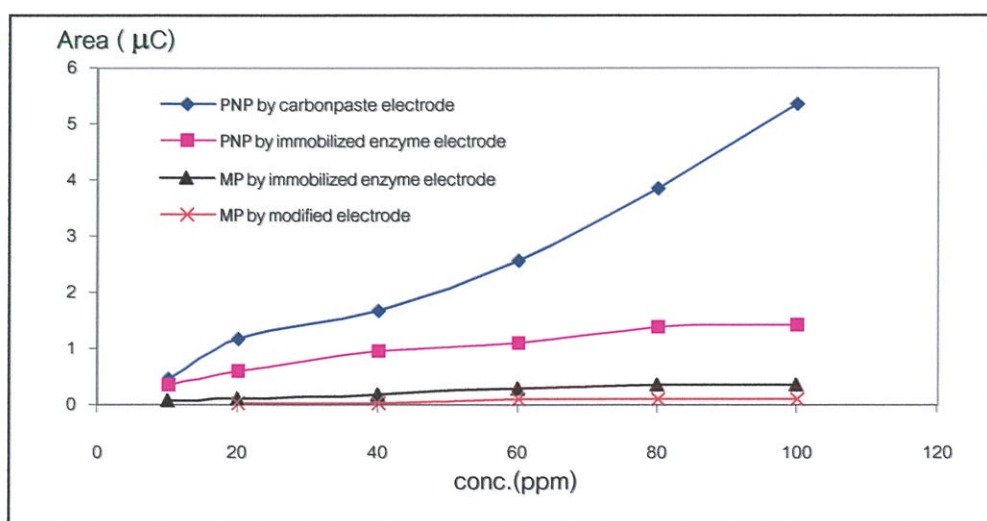
จากรูปที่ 4.14 ในการตรวจวัด PNP ด้วยขั้วคาร์บอนเพสต์ในอัตราส่วนผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ (5 : 5) เทียบกับขั้วอ้างอิง Ag/AgCl มี Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ที่อัตราการไหล 0.2 mL/min ตัวพา Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ปริมาตรสารตัวอย่าง 10, 20 และ 30 μL พบว่าที่ 10 μL มีสภาพไวน้อยที่สุด ส่วนสภาพไวและ R^2 ที่ปริมาตร 20 และ 30 μL เป็นดังนี้ 0.506, 0.989 และ 0.515, 0.981 จะเห็นว่าที่ปริมาตรทั้งสองมีความชันใกล้เคียงกันแต่ในการทดลองนี้เลือกปริมาตรที่ 20 μL เพราะใช้ปริมาตรสารตัวอย่างน้อยกว่า

จากผลการทดลอง 4.8 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการวัด PNP ด้วยระบบการไหลต่อเนื่องมีดังนี้ ขั้วคาร์บอนเพสต์ในอัตราส่วน ผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ 5 : 5 เทียบกับขั้วอ้างอิง Ag/AgCl มี Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย อัตราการไหล 0.2 mL/min พีเอชของตัวพา Tris-HCl 0.1 M เท่ากับ 8.0 ปริมาตรสารตัวอย่างในการวิเคราะห์ 20 μL

การทดลองนี้จะใช้สภาวะดังกล่าวข้างต้นวิเคราะห์ MP โดยใช้ขั้วตรึงเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์จะไฮโดรไลส์ MP เป็น PNP และขั้วจะวัดกระแสแอนโนดิกของ PNP ที่เกิดขึ้น

4.9 ผลการตรวจวัด MP ด้วยสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด PNP และเปรียบเทียบกับการวัด PNP ด้วยขั้วชนิดต่างๆ

การทดลองนี้จะใช้ขั้ว 3 ชนิดคือขั้วคาร์บอนเพสต์ (Carbonpaste electrode) ขั้วปรับสภาพ (Modified electrode) และ ขั้วเอนไซม์ตรึง (Immobilized enzyme electrode) โดยขั้วปรับสภาพทำโดยการเติม PEI และ กูลตารัลดีไฮด์ ส่วนขั้วเอนไซม์ตรึงคือการเติมเอนไซม์ลงในขั้วปรับสภาพ แล้วตรวจวัด PNP และ MP ในสภาวะที่เหมาะสมดังผลการทดลองที่ 4.8

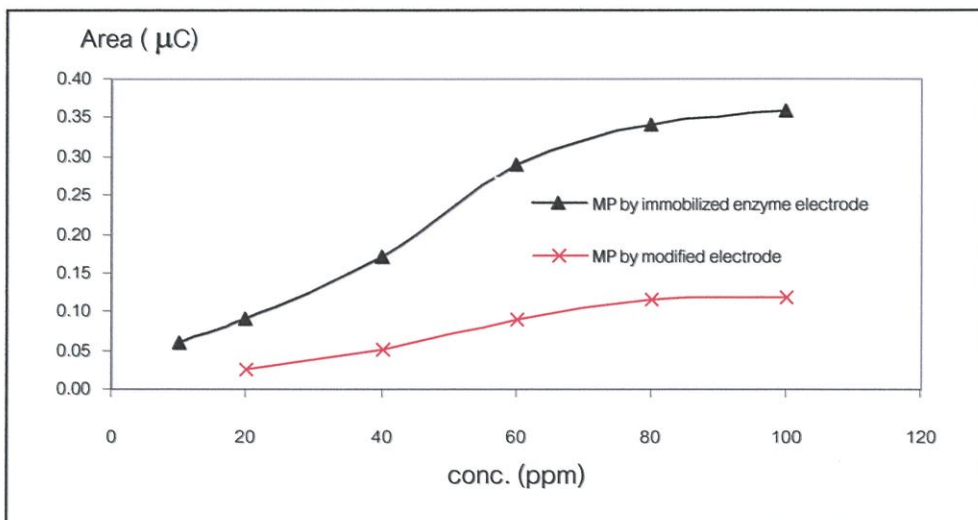


รูปที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์ MP และ PNP ด้วยขั้วชนิดต่างๆ

จากรูปที่ 4.15 เมื่อตรวจวัด PNP ที่ความเข้มข้น 10-100 ppm พบว่าสภาพไวในการตรวจวัด PNP ด้วยหัวเอนไซม์ตรึงนั้นจะมีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรตรวจวัด PNP ด้วยหัวคาร์บอนเพสต์ เพราะในการตรึงเอนไซม์ต้องปรับสภาพผิวหน้าหัวด้วย PEI และสารชนิดนี้จะไปบดบังการส่งถ่าย อิเลคตรอนไปยังหัวคาร์บอนเพสต์ ทำให้สภาพไวในการตรวจวัด PNP ลดลง

เมื่อตรวจวัด MP ด้วยหัวเอนไซม์ตรึงสภาพไวในการตรวจวัดก็จะน้อยกว่าการตรวจวัด PNP ด้วยหัวคาร์บอนเพสต์ เพราะการบดบังการส่งถ่ายอิเลคตรอนด้วยสารปรับสภาพผิวหน้าหัวมีผลทำให้การตรวจวัด PNP ที่เกิดจากการไฮโดรไลส์ MP มีประสิทธิภาพลดลงนั่นก็คือการตรวจวัด MP จะมีประสิทธิภาพลดลงเมื่อเทียบกับการวัด PNP ด้วยหัวคาร์บอนเพสต์

เมื่อขยายรูปที่ 4.15 จะได้ดังรูปที่ 4.16 ดังนี้



รูปที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ MP ด้วยหัวปรับสภาพและหัวเอนไซม์ตรึง

จากรูปที่ 4.16 เมื่อตรวจวัด MP ด้วยหัวเอนไซม์ตรึงสามารถตรวจวัด PNP ที่เกิดจากการไฮโดรไลส์ MP ได้ ดังนั้นแสดงว่าการทดลองนี้สามารถตรึงเอนไซม์ติดบนหัวคาร์บอนเพสต์ที่มีการปรับสภาพหัวได้ นอกจากนี้เมื่อทำการทดลองวัด MP โดยการใช้ หัวปรับสภาพ สามารถตรวจวัด PNP ได้แสดงว่า MP ที่ละลายในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 สามารถไฮโดรไลส์เป็น PNP ได้เองโดยไม่ต้องใช้เอนไซม์ไฮโดรเลสเร่งปฏิกิริยา

จากการทดลองข้างต้นนี้แสดงว่าการตรึงเอนไซม์ไฮโดรเลสจากเอนไซม์ *Burkholderia cepacia* บนหัวคาร์บอนเพสต์สามารถตรวจวัด MP ในระบบการไหลต่อเนื่องได้ แต่ประสิทธิภาพการวัดจะเป็นอย่างไรต้องศึกษาสมบัติของหัวเอนไซม์ตรึงดังกล่าวต่อไป

4.10 สมบัติของขั้วเอนไซม์ตรึง (Immobilized enzyme electrode)

4.10.1 การตอบสนองเชิงเส้น (linear range)

จากรูปที่ 4.16 การตอบสนองเชิงเส้นของ MP ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยขั้วเอนไซม์ตรึงโดยการสร้างกราฟ linear regression ดังภาคผนวกที่ ข.4.1 พบว่า การตรวจวัดครั้งนี้จะได้ผลดีในการตรวจวัด MP ที่ช่วงความเข้มข้น 10 – 80 ppm $r^2 = 0.989$

4.10.2 สภาพไวของขั้ว (Sensitivity)

สภาพไว หาจากความชันของกราฟ linear regression ดังภาคผนวกที่ ข.4.1 พบว่า การตรวจวัด MP ด้วยขั้วเอนไซม์ตรึงนี้มีสภาพไวเป็น 0.0044 $\mu\text{C}/\text{ppm}$

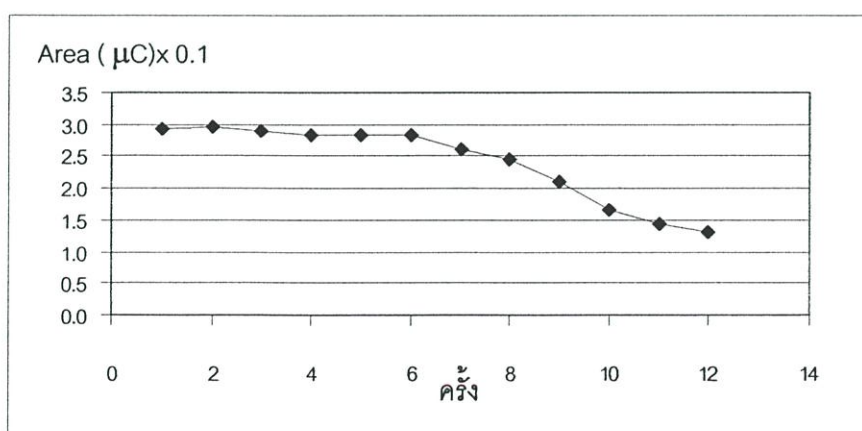
4.10.3 ขีดจำกัดความเข้มข้นในการวิเคราะห์ (Detection limit)

การหาขีดจำกัดความเข้มข้นในการวิเคราะห์โดยการหาพื้นที่พีคของสารละลายแบบลงค์ ที่เวลา 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 วินาที แล้วนำมาหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน นำส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานคูณ 3 (ที่ความเชื่อมั่น 95 %) ค่าที่ได้ไปหาความเข้มข้นของ MP ในสมการเส้นตรง ดังภาคผนวกที่ 4.2 พบว่า ขั้วเอนไซม์ตรึงสามารถตรวจวัด MP ที่ความเข้มข้นต่ำสุดได้เป็น 2.58 ppm

4.10.4 อายุการใช้งานของขั้ว (life time)

1. อายุการใช้งานของขั้วใน 1 วัน

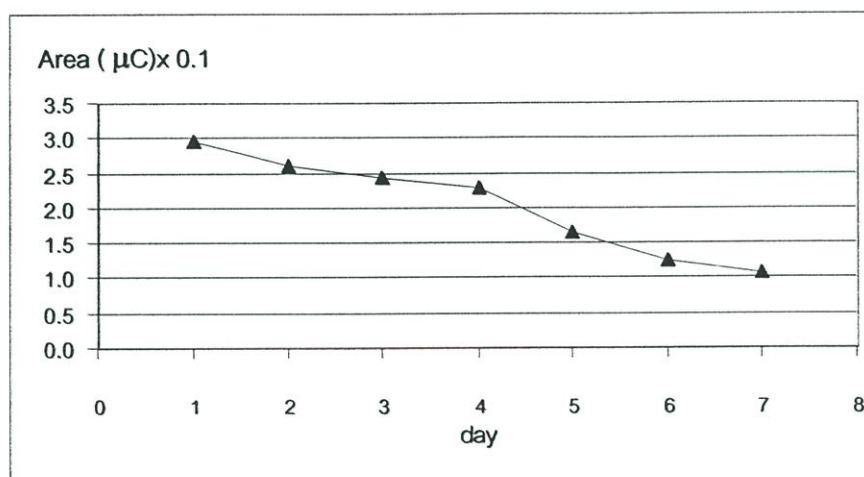
เมื่อตรวจวัด MP ที่มีความเข้มข้น 60 ppm ด้วยขั้วเอนไซม์ตรึง 3 ชั่วโมงแล้วปิดเครื่อง เปิดเครื่องใหม่ทำเช่นเดียวกันนี้จนปริมาณกระแสที่ลดลง 50 % มีผลการทดลองดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 ผลของขั้วเอนไซม์ตรึงในการใช้งาน 1 วัน 12 ครั้ง

จากรูปที่ 4.17 พบว่าพื้นที่พีคจะค่อยๆลดลงเมื่อใช้งานไป 6 ครั้งหลังจากนั้น จะลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งครั้งที่ 11 พื้นที่พีคจะลดลงมากกว่า 50 % แสดงว่าชีวเอนไซม์ตรึงนี้มีความสามารถในการตรวจวัด MP 60 ppm 3 ซ้ำ ได้ประมาณ 10 ครั้ง ใน 1 วัน

2. อายุการใช้งาน 1 ครั้ง ในเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.18 ผลของอายุการใช้งานของชีวเอนไซม์ตรึง 1 ครั้งในเวลา 7 วัน

เมื่อศึกษาผลการตรวจวัด MP วันละครั้ง 3 ซ้ำ เป็นเวลา 7 วันพบว่าประสิทธิภาพชีวค้อยๆ ลดลงเรื่อยๆ และลดลงมากกว่า 50% หลังจากวันที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์อิสระที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C และเมื่อตรึงเอนไซม์บนชีวแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่า การตรึงเอนไซม์บนชีวทำให้การทำงานของเอนไซม์มีเสถียรภาพมากขึ้น จากเดิมเอนไซม์อิสระสามารถทำงานได้ดีภายใน 3 วัน เมื่อตรึงเอนไซม์แล้วเอนไซม์สามารถทำงานได้ 5 วัน

4.10.5 ความเป็นรีโพรดูซิเบิลในการตรึงเอนไซม์ (Reproducibility)

เมื่อมีการตรึงเอนไซม์ 5 ครั้งบนชีวคาร์บอนเพสต์ที่ได้ผลดังตารางที่ ข.23 พบว่า % RSD ของการตรึงเอนไซม์บนชีวคาร์บอนเพสต์มีค่าเป็น 19.75 ซึ่งเป็นค่าที่ไม่ค่อยดีนักสำหรับการเตรียมชีวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ที่เป็นเช่นนี้เพราะการสกัดเอนไซม์และเก็บเอนไซม์ในวิธีดังกล่าวยังไม่ค่อยดีนัก นอกจากนั้นการทดลองนี้ยังไม่ได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ในวิธีดังกล่าว หากมีผู้สนใจหาสภาวะการตรึงที่เหมาะสมกว่านี้ อาจทำให้การตรึงเอนไซม์มีประสิทธิภาพมากกว่านี้ก็เป็นได้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การสกัดเอนไซม์ไฮโดรเลส จากเซลล์ *Burkholderia cepacia* เริ่มจากการเลี้ยงเซลล์ *Burkholderia cepacia* ATCC25416 ในอาหาร LB ที่มีคาร์บอนเติม MP 10 ppm บนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บเซลล์ในขณะที่เซลล์มีอายุ 13-15 ชั่วโมง

2. เอนไซม์ไฮโดรเลสที่เซลล์ *Burkholderia cepacia* ATCC25416 ผลิตนั้น มีการทำงานที่ดีในบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 8.0 เท่ากับ 11.55 $\mu\text{mol}/\text{min}$ Specific activity 12.80 unit /min หลังจากสกัดเอนไซม์แล้ว ควรตรึงเอนไซม์ในทันที เพราะเอนไซม์มี เสถียรภาพอยู่ในช่วง 3 วัน เท่านั้น

3. คาร์บอนเพลท์ที่ใช้เป็นขั้วทำงานสำหรับการวิเคราะห์ PNP ควรใช้อัตราส่วนผงแกรไฟต์ต่อพาราฟินออยล์ (5 : 5)

4. สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด PNP คือการวัดในระบบการไหลต่อเนื่องมีขั้วคาร์บอนเพลท์ เป็นขั้วทำงาน Ag/AgCl เป็นขั้วอ้างอิง และ Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย โดยให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่เท่ากับ 0.95 V อัตราการไหลของตัวพา Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 เป็น 0.2 mL/min ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 μL

5. สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด MP เช่นเดียวกับการวัด PNP แต่ต้องปรับสภาพขั้วคาร์บอนเพลท์ด้วย PEI และกลูตารัลดีไฮด์ก่อนเติมเอนไซม์ไฮโดรเลส เอนไซม์ดังกล่าวจะไฮโดรไลส์ MP กลายเป็น PNP แล้ว PNP จะสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้วตรวจวัดกระแสที่เกิดขึ้นได้ ขั้วเอนไซม์ตรึงนี้มีค่าการตอบสนองเชิงเส้นในการตรวจวัด MP เป็น 2.58 – 80 ppm ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด 2.58 ppm อายุการใช้งานในการตรวจวัด MP 60 ppm 3 ชั่วโมง ใน 1 วันสามารถเปิด-ปิดเครื่องแล้วตรวจวัดได้ 10 ครั้ง หากตรวจวัด MP 60 ppm 3 ชั่วโมง 1 ครั้งต่อวันสามารถใช้ขั้วได้ 5 วัน

6. การตรึงเอนไซม์ไฮโดรเลสจาก *Burkholderia cepacia* ATCC25416 สามารถทำให้เอนไซม์มีเสถียรภาพในการเก็บที่อุณหภูมิ 4°C มากกว่าเอนไซม์อิสระ

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากกระบวนการสกัดและเก็บเอนไซม์ในการทดลองนี้ยังไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากไม่มีความพร้อมทางด้านเครื่องมือ และในการทดลองนี้ไม่ได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์บนขั้ว หากผู้สนใจสามารถสกัดเอนไซม์ได้ดีกว่านี้ และลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์นี้ การวิเคราะห์เมทิลพาราไทออนด้วยขั้วดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพสูงกว่านี้

บรรณานุกรม

- กองวัตภูมิพิษการเกษตร. 2540. การประชุมวิชาการกองวัตภูมิพิษ กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ครั้งที่ 2. โรงแรมเฟลิซริเวอร์แคว อ.เมือง กาญจนบุรี.
- นวลพรรณ ณ ระนอง. 2539. ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระ
จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. หน้า 1-5.
- มงคลชัย ปฎิภาณารุณ. 2543. การศึกษาหัตถ์ทางเคมีไฟฟ้าสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอล.
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเคมีวิเคราะห์ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยี
พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Adhya, TK., Sudhakar, B., and Sethunathan, N. (1981). "Hydrolysis of Selected Organophosphorus
Insecticides by Two Bacterial Isolated from Flooded Soil." *Appl. Bacteriol.* 50,167-172.
- Asenjo, J.A. and Patrick, I. (1990). *Protein Purification Applications*. UK : Harris and S. Angel IRL Press.
pp. 1-29.
- Barik, S. (1984). *Insecticide Microbiology*. Germany : Springer- Verlag, . 87-130.
- Barik, S., Siddaramappa, R. and Sethunathan, N. (1976). "Metabolism of Nirophenols by Bacteria
Isolated from Parathion Amended Flood soil." *Antonie van Leeuwenhoek.* 42, 461-470.
- Burkholder, W. (1950). "Sour Skin, A Bacterial Rot of Onion Bulbs." *Phytopathology.* 40, 115-118.
- Cartwright, D., Chilton, C. and Benson, D. (1995). "Pyrolnitrin and Phenazine Production by
Pseudomonas cepacia Strain 5.5 B, a Biocontrol Agent of *Rhizoctonia solani*." *Appl.*
Microbiol. Biotechnol. 43, 211-216.
- Chang, M.L. and Chang, C.M. (2001). "Voltammetric Determination of Sunscreen by Convenient
Epoxy-Carbon Composite Electrodes." *Food and Drug Analysis.* 9(4), 199-206.
- Chaudbry, G.R., Ali, A.N. and Wheeler, W.B. (1988). "Isolation of a Methyl Parathion Degrading
Pseudomonas sp. That Possesses DNA Homologous to the Opd Gene a *Flavobacterium* sp." *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 288-293.
- Chough, S.H., Mulchandani, A., Mulchandani, P., Chen, W., Wang, J. and Roger, K.R. (2002).
"Organophosphorus Hydrolase-Base Amperometric Sensor : Modulation of Sensitivity and Substrate
Selectivity." *Electroanalysis.* 14(4), 273-276.

- Collin, L.D. and Daugulis, A.J. (1997). "Biodegradation of Phenol at High Initial Concentrations in Two-Phase Partitioning Batch and Fed-batch Bioreactors." *Biotechnol. and Bioeng.* 55(1), 155-162.
- Cortez, L. Chapalamadugu, S. and Chaudhry, G.R. (1989). "The Biodegradation of Methyl Parathion and p-Nitrophenol by *Pseudomonas* spp." *Am. Soc. Microbiol.* 274, 293-296.
- Dumas, D.P., Caldwell, S.R., Wild, J.R. and Raushel, F.M., (1989). "Purification and Properties of the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*." *Biol. Chem.* 264(33), 19659-19665.
- Extension Toxicology Network. "Pesticide information profile." [online] [http : pmep.cce.cornell.edu/](http://pmep.cce.cornell.edu/) 2002.
- Goldstein, R. (1995). "Transmission Electron Micrograph of Toronto/Edinburgh Epidemic Clone of *B.cepacia* Expressing CF Mucous-Binding Cbi Adhesin Pili." *Bacteriol.* 177, 1039-1052.
- Hayatsu, M., Hirano, M. and Tokuda, S. (2000). "Involvement of Two Plasmids in Fenitrothion Degradation by *Burkholderia* sp. Strain NF100." *Appl. and Environ. Microbiol.* 6(4), 1737-1740.
- Holmes, A., Govan, J. and Goldstein, R. (1998). "Agricultural Use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* : A Threat to Human Health." *Emerging Infectious Diseases.* 4(2), 791-796.
- Kang, D.G., Kim, J.Y.H. and Cha, H.J. (2002). "Enhanced Detoxification of Organophosphate Using Recombinant *Escherichia coli* with Co-expression of Organophosphorus Hydrolase and Bacteria Hemoglobin." *Biotechnol. and Bioeng.* 13(4), 138-141.
- Keprasertsup, C. (1995). **Degradation of Methyl Parathion in Aqueous Medium by Soil Bacteria.** A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of The Requirements for The Degree of Master of Sciences (environmental biology). Faculty of Graduate Studies Mahidol University.
- Keprasertsup, C., Upatham, S., Sukhapanth, N. and Prempre, P. (2001). "Degradation of Methyl Parathion in an Aqueous Medium by Soil Bacteria." *Science Asia.* 27, 261-270.
- Khajamohiddin, S., Manavathi, B., Pakala, S.B. and Merrick, M. (2003). "Transposon-link Organization of the Plasmid-Borne Organophosphate Degradation (opd) Gene Cluster Found in *Flavobacterium* sp." *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5), 2533-2539.
- Lal, R. (1982). "Accumulation Metabolism and Effects of Organophosphorus insecticides on microorganisms." *Appl. Microbiol.* 28, 149-199.
- Lewis, DL., and Holm, H.W. (1981). "Rate of Transformation of Methyl Parathion and Diethyl Phthalate by Aufwuchs Microorganisms." *Appl. and Environ. Microbiol.* 50, 553-557.

- Manowitz, P. (1995). "Galactose Biosensors Using Composite Polymer to Present Interferences." **Biosens. and Bioelectron.** 10,359-370.
- Mee-Hie Cho, C., Mulchandani, A. and Chen, W. (2002). "Bacterial Cell Surface Display of Organophosphorus Hydrolase for Selective Screening of Improved Hydrolysis of Organophosphate Nerve Agent." **Appl. and Environ. Microbiol.** 68(4), 2026-2030.
- Mulbry, W.W. and Kams, J.S. (1989). "Purification and Characterization of Three Parathion Hydrolase from Gram-Negative Bacteria Strains". **Appl. and Environ. Microbiol.** 55(2), 289 -293
- Mulchandani, A. and Chen, W. (1999). "Final Report : Application of Surface Expressed Phosphotriesterase for Detoxification and Monitoring of Organophosphorus Pesticide." **Nation Center for Environment Research USEPA.**
- Mulchandani, A., Mulchandani, P. and Chen, W. (1998). "Enzyme Biosensor for Determination of Organophosphates." **Anal. Chem. and Technol.** 2(6), 363-369.
- Mulchandani, A., Chen, W., Mulchandani, P. and Chen, L. (2001). "Amperometric Microbial Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents Using Recombinant *Moraxella* sp. With Surface Expressed Organophosphorus Hydrolase." **Biosens. and Bioelectron.** 16(7), 433-437.
- Mulchandani, A., Kaneva, I. and Chen, W. (1998). "Microbial Biosensor for Direct Determination of Organophosphosphate Nerve Agents Using Recombinant *Escherichia coli* with Surface Expressed Organophosphorus Hydrolase. 2. Fiber-Optic Microbial Biosensor." **Anal. Chem.** 70, 5042-5046.
- Mulchandani, A., Kaneva, I. and Chen, W. (1999). "Detoxification of Organophosphate Nerve Agent by Immobilized *Escherichia coli* with Surface-Expressed Organophosphorus Hydrolase." **Biotechnol and Bioeng.** 63(2), 216-223.
- Mulchandani, A., Mulchandani, P., Chen, W., Wang, J. and Chen, L. (1999). "Amperometric Thick-Film Strip Electrode for Monitoring Organophosphate Nerve Agents Based on Immobilized Organophosphorus Hydrolase." **Anal. Chem.** 70, 2246-2249.
- Mulchandani, P., Mulchandani, A., Kaneva, I. and Chen, W. (1999). "Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents. 1. Potentiometric enzyme electrode." **Biosens. and Bioelectron.** 14, 77-85.
- Munnecke, D.M. (1976). "Enzymatic Hydrolysis of Organophosphate Insecticides, a Possible Pesticide Disposal Method." **Appl. and Environ. Microbiol.** 32, 7-13.

- O' Brien, P.J. and Herchlag, D. (2001). "Functional Interrelationships in the Alkaline Phosphatase Superfamily : Phosphotriesterase Activity of *Escherichia coli* Alkaline Phosphatase." **Biochem.** 40, 5691-5699.
- Rainina, E.I., Efremenco, E.N. and Varfolomeyev, S.D. (1996). "The Development of a New Biosensor Based on Recombinant *E.coli* for the Direct Detection of Organophosphorus Neurotoxins." **Biosens. and Bioelectron.** 11(10), 991-1000.
- Raymond, D.G.M. and Alexander, M. (1971). "Microbial Metabolism and Co-Metabolism of Nitrophenols." **Pestic. Biochem. and Phy.** 1, 1123-130.
- Richins, R.D., Mulchandani, A. and Chen, W. (2000). "Expression Immobilization and Enzymatic Characterization of Cellulose-Binding Domain-Organophosphorus Hydrolase Fusion Enzymes." **Biotechnol. and Bioeng.** 69(6), 591-596.
- Rogers, K.R., Wang, Y., Mulchandani, A., Mulchandani, P. and Chen, W. (1999). "Organophosphorus Hydrolase-Base Assay for Organophosphate Pesticide." **Biotechnol.Prog.** 15, 517-521.
- Ruana, J. and Urebe, I. (1993). "Determination of Phenols at The ng/l level in Drinking and River Waters by Liquid Chromagrophy with UV and Electrochemical Detection." **Chromatogr.** 655, 217-220.
- Sacks, V., Eshkenazi, I., Neufeld, T., Dosoretz, C. and Rishpon, J. (2000). "Immobilized Parathion Hydrolase: An Amperometric Sensor for Parathion." **Anal. Chem.** 72(9), 2055-2058.
- Scope, R.K. (1987). **Principle and Practice.** 2nd ed. New York : Springer-Verlag Inc. pp.35-38.
- Settle, F.A. (1997). **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry.** New jersey : Prentice Hall. pp. 375-400.
- Sharmila, M., Ramanand, K., Adhya, TK. and Sethunathan, N. (1988). **Insecticide Microbiology.** Lal R. Springer- Verlag. Germany. pp. 87-130.
- Shimazu, M., Mulchandani, A. and Chen, W. (2002). "Thermally Triggered Purification and Immobilization of Elastin-Oph Fusion." **Biotechnol. and Bioeng.** 81(1), 74-79.
- Spain, J.C., Gibson, D.T. (1991). "Pathway for Biodegradation of p-Nitrophenol in a *Moraxella* sp." **Appl. and Environ. Microbiol.** 57, 812-819.

- Srisopa, A. **Determination of Methyl Parathion Residues by Flow Injection Analysis.** A Thesis Submitted to The Requirements for The Degree of Master of Science in Chemistry. Graduate School Chiangmai University. 1999.
- Wang, J. (2000). **Analytical chemistry.** 2nd Ed. New York: Wiley VCH.
- Wang, J., Chen, L., mukchandani, A., Mulchandani, P. and Chen, W. (1999). "Remote Biosensor for In-Situ Monitoring of Organophosphate Nerve Agents." **Electroanalysis.** 11(12), 866-869.
- Wu, C., Cha, H.J., Vslides, J.J. and bentley, W.E. (2002). "GFP-Visualized Immobilized Enzyme: Degradation of Paraoxon via Organophosphorus Hydrolase in Packed Column." **Biotechnology and Bioengineering.** 77(2), 212-228.
- Yamkunthong, W. **Isolation and Purification of The Methyl Parathion Hydrolase Enzyme from Methyl Parathion Degrading *Pseudomonas* sp.** A Thesis Submitted in Partial Fulilment of The Requirement for The Degree of Master of Science, Faculty of Graduate Studies Mahidol University. 2000.
- Zhongli, C., Shunpeng, L. and Guoping, F. (2001). " Isolation of methyl parathion degradation strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene." **Applied and Environmental Microbiology.** 67(10), 4922-4925.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย

1. อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ Luria Broth (LB) (g/L)
ชั่ง Typtone 10 g Yeast extract 5 g NaCl 10 g ในบีกเกอร์ละลายน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร
ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 mL
* ทำให้เป็นอาหารแข็งโดยเติม Agar 2%
2. MP 1000 ppm (สำหรับเติมในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์)
ชั่ง MP 100 mg ในบีกเกอร์เติม Absolute ethanol ปรับปริมาตรด้วย Absolute ethanol ในขวด
ปรับปริมาตรขนาด 100 mL
3. Tris (hydroxy methyl) amino methane 0.2 M 100 mL
ชั่ง Tris (hydroxy methyl) amino methane 2.4228 g ในบีกเกอร์ละลายน้ำ DI แล้วปรับปริมาตร
ด้วยน้ำ DI ในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL
4. Tris (hydroxy methyl) amino methane hydrochloric acid 0.2 M 100 mL
ชั่ง Tris (hydroxy methyl) amino methane hydrochloric acid 3.152 g ในบีกเกอร์ละลายน้ำ
DI แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL
5. สารละลาย Osmotic shock 100 mL
ชั่ง $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.066 g ในบีกเกอร์ ปิเปต Tris (hydroxy methyl) amino methane 0.2 M 3.5
mL ปิเปต Tris (hydroxy methyl) amino methane hydrochloric acid 0.2 M 21.5 mL ละลายน้ำ
กลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL
6. Tris-HCl buffer 0.1 M pH 8.0 100 mL
ปิเปต Tris (hydroxy methyl) amino methane 0.2 M 11.35 mL และ Tris (hydroxy methyl)
amino methane hydrochloric acid 0.2 M 13.65 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL ปรับ
ปริมาตรด้วยน้ำ DI

7. Tris-HCl buffer 0.1 M pH 7.0 50 mL

ปิเปต Tris (hydroxy methyl) amino methane 0.2 M 1.93 mL และ Tris (hydroxy methyl) amino methane hydrochloric acid 0.2 M 23.01 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI

8. Tris-HCl buffer 0.1 M pH 9.0 50 mL

ปิเปต Tris (hydroxy methyl) amino methane 0.2 M 22.32 mL และ Tris (hydroxy methyl) amino methane hydrochloric acid 0.2 M 2.68 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI

9. MP 50 ppm ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 50 mL

ปิเปต MP 1000 ppm 2.5 mL Tris (hydroxy methyl) amino methane 0.2 M 11.35 mL และ Tris (hydroxy methyl) amino methane hydrochloric acid 0.2 M 13.65 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ในขวดปรับปริมาตรจนได้ 50 mL

10. MP 50 ppm ใน Tris-HCl 0.1 M pH 9.0

ปิเปต MP 1000 ppm 2.5 mL Tris (hydroxy methyl) amino methane 0.2 M 22.32 mL และ Tris (hydroxy methyl) amino methane hydrochloric acid 0.2 M 2.68 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ในขวดปรับปริมาตรจนได้ 50 mL

11. MP 50 ppm ใน Tris-HCl 0.1 M pH 7.0

ปิเปต MP 1000 ppm 2.5 mL Tris (hydroxy methyl) amino methane 0.2 M 1.93 mL และ Tris (hydroxy methyl) amino methane hydrochloric acid 0.2 M 23.01 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ในขวดปรับปริมาตรจนได้ 50 mL

12. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 M 100 mL

ชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.12 g ในบีกเกอร์ ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL

13. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2 M 100 mL

ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.16 g ในบีกเกอร์ ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 mL

14. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.0 25 mL

ปิเปต $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 M 7.63 mL และ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.88 mL ปรับปริมาตร ด้วยน้ำในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 mL

15. กลูตาไรลดีไฮด์ 2.5 % ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.0 25 mL

ปิเปตกลูตาไรลดีไฮด์ 50 % 0.5 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 mL เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 จนได้ปริมาตร 25 mL

16. สารละลาย Coomassie Brilliant Blue G 250 50 mL

ชั่ง Coomassie Brilliant Blue G 250 2.5 mg ในบีกเกอร์เติม Absolute alcohol 2.5 mL คนให้ ละลายเติม Phosphoric acid 5 mL เทใส่ขวดปรับปริมาตรแล้วปรับด้วยน้ำ DI ให้ได้ 50 mL

17. สารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) 1000 ppm 100 mL (Stock)

ชั่ง BSA 100 mg ในบีกเกอร์ละลายด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 100 mL

18. PNP 50 ppm ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 8.0 50 mL

ชั่ง PNP 0.348 g ในบีกเกอร์ ปิเปต Tris (hydroxy methyl) amino methane 0.2 M 11.35 mL และ Tris (hydroxy methyl) amino methane hydrochloric acid 0.2 M 13.65 mL ปรับปริมาตรให้ได้ 50 mL ในขวดปรับปริมาตร

19. Polyethylene imine (PEI) 0.5 % 25 mL

ปิเปต PEI 50 % 0.25 mL ลงในขวดปรับปริมาตร 25 mL เติมน้ำ DI จนได้ปริมาตร 25 mL

ภาคผนวก ข
ข้อมูลผลการทดลอง

ข.1 การวัดการเจริญเติบโตและการวัดแอกทีวิตีของเอนไซม์

ข.1.1 ผลการวัดการเจริญเติบโต

ตารางที่ ข.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของเซลล์ *Burkholderia cepacia* ในอาหาร LB
ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

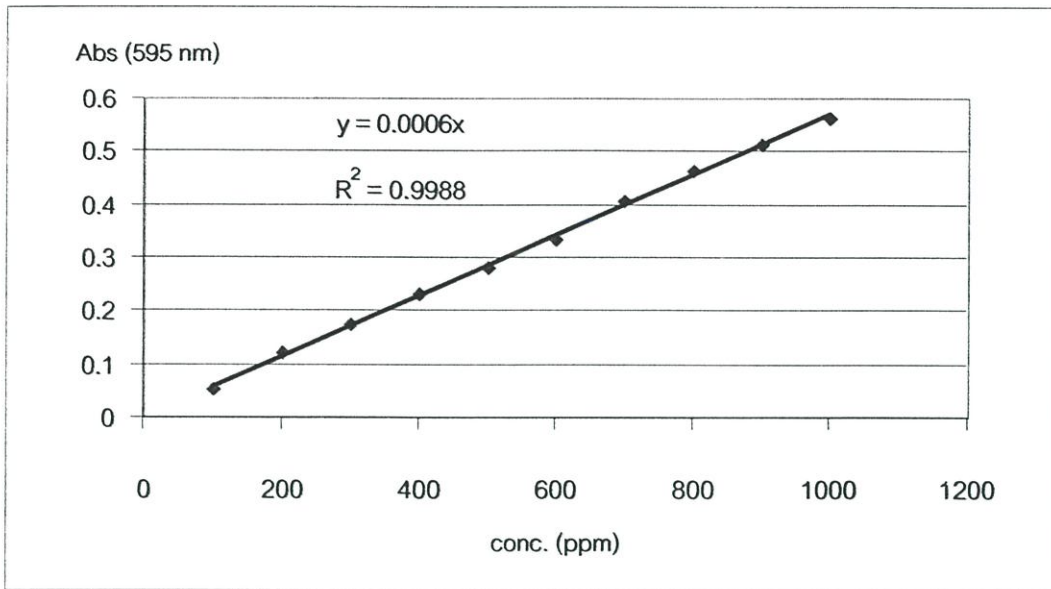
| เวลา (ชั่วโมง) | ค่าการดูดกลืนแสง (Abs 600 nm) | | | |
|----------------|-------------------------------|-------|-------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| 0 | 0.009 | 0.007 | 0.009 | 0.008 |
| 3 | 0.078 | 0.086 | 0.083 | 0.082 |
| 6 | 0.462 | 0.531 | 0.450 | 0.481 |
| 9 | 1.195 | 1.251 | 1.340 | 1.262 |
| 12 | 1.580 | 1.782 | 1.591 | 1.651 |
| 15 | 4.863 | 1.952 | 1.888 | 1.901 |
| 18 | 1.930 | 1.980 | 1.950 | 1.953 |
| 21 | 1.856 | 1.895 | 1.860 | 1.870 |
| 24 | 1.929 | 2.103 | 1.936 | 1.989 |

ข.1.2 หาปริมาณโปรตีน

สร้างกราฟมาตรฐานโปรตีนจากสารมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ทำปฏิกิริยากับ Coomassie Brilliant Blue G-250 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

ตารางที่ ข.2 ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานของการหาปริมาณโปรตีน

| ความเข้มข้น BSA (ppm) | ปริมาตร BSA (μL) | ปริมาตร Coomassie Brilliant Blue G-250 (mL) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm |
|--------------------------|-------------------------------|---|-------------------------------|
| blank | น้ำกลั่น 50 | 4 | 0.000 |
| 100 | 50 | 4 | 0.052 |
| 200 | 50 | 4 | 0.120 |
| 300 | 50 | 4 | 0.175 |
| 400 | 50 | 4 | 0.232 |
| 500 | 50 | 4 | 0.282 |
| 600 | 50 | 4 | 0.335 |
| 700 | 50 | 4 | 0.408 |
| 800 | 50 | 4 | 0.463 |
| 900 | 50 | 4 | 0.513 |
| 1000 | 50 | 4 | 0.563 |
| ตัวอย่าง | 50 | 4 | 0.541 |



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐาน BSA ในการหาปริมาณโปรตีน

วิธีคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง (mg/mL)

$$\frac{\text{Abs}_{595\text{nm}} \times (1\text{mL})}{\text{slope} \times 1000\text{mL}} = 0.902\text{ mg/mL}$$

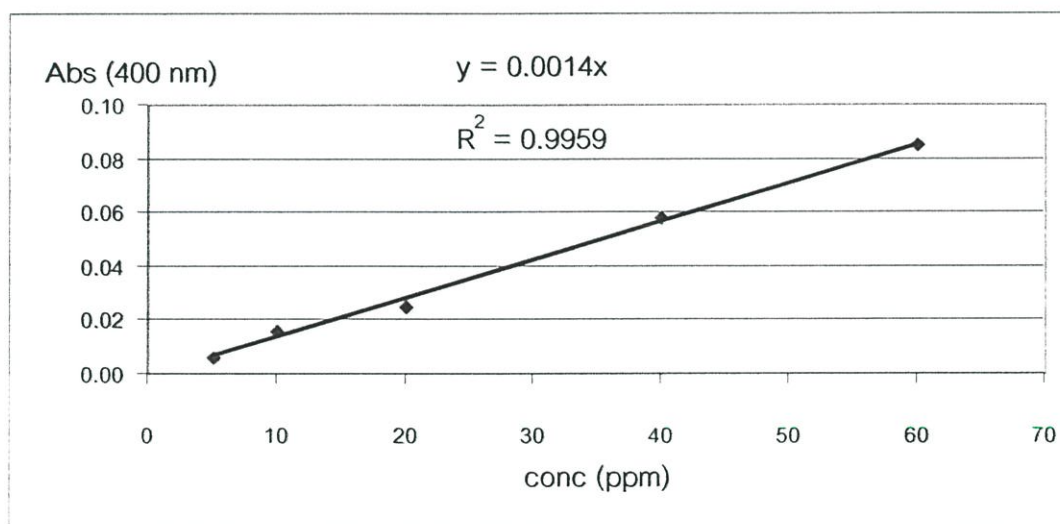
ดังนั้นสามารถโปรตีนที่สกัดได้มีความเข้มข้นเป็น 0.902 mg/mL

ข.1.3 หาแอกทิวิตีของเอนไซม์ในเวลา 20 นาที

หาปริมาณ PNP ที่เกิดขึ้นโดยการสร้างกราฟมาตรฐาน PNP ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วเตรียม MP 50 ppm ใน Tris-HCl 0.1 M pH 7.0, 8.0, 9.0 (Substrate) และให้ MP 50 ppm Tris-HCl 0.1 M pH 7.0, 8.0, 9.0 เป็นแบลนด์ (กด Auto zero) ใส่เอนไซม์ที่ตกตะกอนได้ 50 μL วัดค่าดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นในเวลา 20 นาที

ตารางที่ ข.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างของ PNP

| ความเข้มข้นของ BSA (ppm) | Abs 400 nm |
|--------------------------|------------|
| 5 | 0.06 |
| 10 | 0.016 |
| 20 | 0.025 |
| 40 | 0.058 |
| 60 | 0.085 |
| เอนไซม์ใน pH 7.0 | 0.011 |
| เอนไซม์ใน pH 8.0 | 0.045 |
| เอนไซม์ใน pH 9.0 | 0.022 |



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐาน PNP ในการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์

วิธีการคำนวณแอกทิวิตี (Activity : $\mu\text{mol}/\text{min}$)

$$\frac{\text{Abs}_{400\text{nm}} \times 1(\mu\text{mol}) \times 10^{-3} (\text{mg})}{\text{slope} \times \text{M.W.}(\text{PNP}) \times 10^{-6} (\text{mol}) \times 20\text{min}}$$

แทนค่าที่

pH 7.0 = 2.824 $\mu\text{mol}/\text{min}$

pH 8.0 = 11.55 $\mu\text{mol}/\text{min}$

pH 9.0 = 5.648 $\mu\text{mol}/\text{min}$

วิธีการคำนวณ Specific activity (unit/mg)

$$\frac{\text{Activity}}{\text{ปริมาณโปรตีน (mg)}}$$

ดังนั้น specific activity ของเอนไซม์

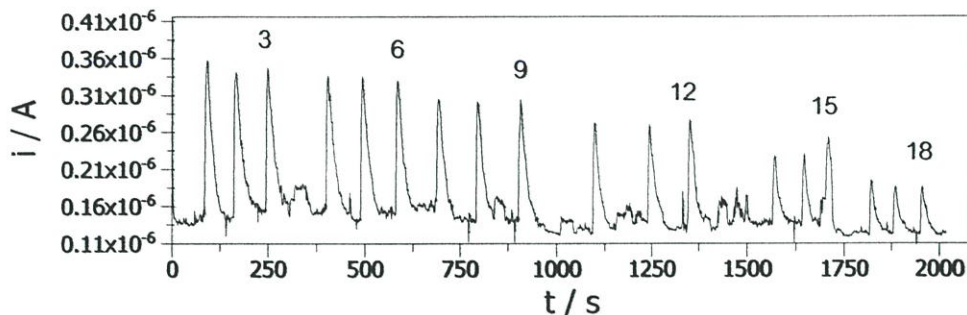
pH 7.0 = 3.10 (unit/mg)

pH 8.0 = 12.80 (unit/mg)

pH 9.0 = 6.26 (unit/mg)

ข.2 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของการวัด PNP ด้วยหัวคาร์บอนเพสต์ ในระบบการไหลต่อเนื่อง

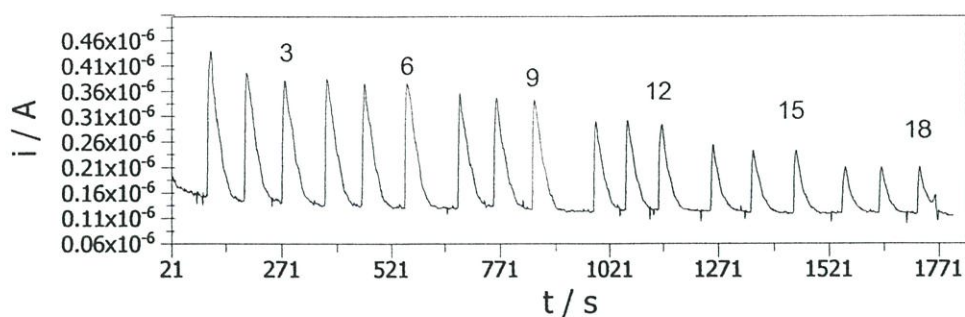
ข.2.1 ผลของอัตราการไหลในการวัด PNP



รูปที่ ข.3 แอมเพอโรไวลเทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V
ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L อัตราเร็วของตัวพา 0.3 mL/min

ตารางที่ ข.4 พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ข.3

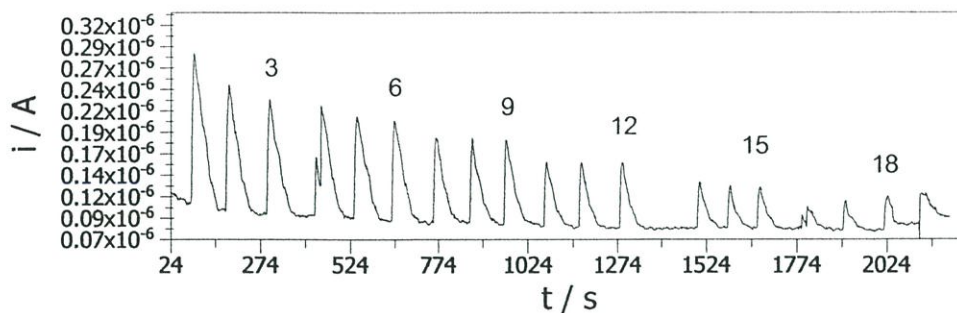
| ลำดับที่ | ความเข้มข้นของ PNP (ppm) | พื้นที่ใต้พีค (μ C) | พื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย (μ C) |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1 | 100 | 3.97 | 3.99 |
| 2 | | 4.29 | |
| 3 | | 3.70 | |
| 4 | 80 | 3.63 | 3.77 |
| 5 | | 4.01 | |
| 6 | | 3.67 | |
| 7 | 60 | 2.97 | 2.92 |
| 8 | | 2.89 | |
| 9 | | 2.90 | |
| 10 | 40 | 2.40 | 2.32 |
| 11 | | 2.18 | |
| 12 | | 2.37 | |
| 13 | 20 | 1.12 | 1.15 |
| 14 | | 1.13 | |
| 15 | | 1.19 | |
| 16 | 10 | 0.82 | 0.86 |
| 17 | | 0.78 | |
| 18 | | 0.98 | |



รูปที่ ข.4 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L อัตราเร็วของตัวพา 0.25 mL/min

ตารางที่ ข.5 พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ข.4

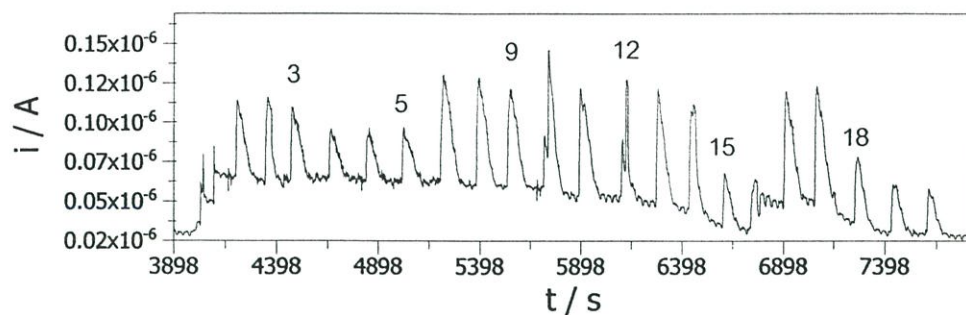
| ลำดับที่ | ความเข้มข้นของ PNP (ppm) | พื้นที่ใต้พีค (μ C) | พื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย (μ C) |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1 | 100 | 7.23 | 6.43 |
| 2 | | 6.02 | |
| 3 | | 6.04 | |
| 4 | 80 | 5.91 | 6.05 |
| 5 | | 5.62 | |
| 6 | | 6.62 | |
| 7 | 60 | 5.42 | 5.22 |
| 8 | | 5.27 | |
| 9 | | 4.96 | |
| 10 | 40 | 4.10 | 4.06 |
| 11 | | 3.99 | |
| 12 | | 4.09 | |
| 13 | 20 | 2.63 | 2.63 |
| 14 | | 2.60 | |
| 15 | | 2.66 | |
| 16 | 10 | 1.82 | 1.77 |
| 17 | | 1.82 | |
| 18 | | 1.66 | |



รูปที่ ข.5 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μL อัตราเร็วของตัวพา 0.20 mL/min

ตารางที่ ข.6 พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ข.5

| ลำดับที่ | ความเข้มข้นของ PNP (ppm) | พื้นที่ใต้พีค (μC) | พื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย (μC) |
|----------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 100 | 6.35 | 5.27 |
| 2 | | 4.92 | |
| 3 | | 4.54 | |
| 4 | 80 | 4.16 | 4.10 |
| 5 | | 4.21 | |
| 6 | | 3.93 | |
| 7 | 60 | 2.97 | 2.74 |
| 8 | | 2.59 | |
| 9 | | 2.66 | |
| 10 | 40 | 1.81 | 1.89 |
| 11 | | 1.95 | |
| 12 | | 1.92 | |
| 13 | 20 | 1.11 | 1.06 |
| 14 | | 0.99 | |
| 15 | | 1.07 | |
| 16 | 10 | 0.73 | 0.68 |
| 17 | | 0.66 | |
| 18 | | 0.73 | |
| 19 | | 0.59 | |



รูปที่ ข.6 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L อัตราเร็วของตัวพา 0.15 mL/min

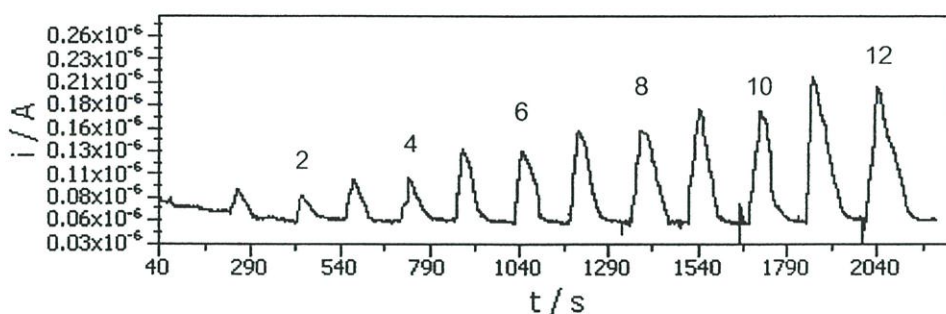
ตารางที่ ข.7 พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ข.6

| ลำดับที่ | ความเข้มข้นของ PNP (ppm) | พื้นที่ใต้พีค (μ C) | พื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย (μ C) |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1 | 20 | 2.20 | 2.17 |
| 2 | | 1.90 | |
| 3 | | 2.40 | |
| 4 | 10 | 1.28 | 1.41 |
| 5 | | 1.33 | |
| 6 | | 1.63 | |
| 7 | 40 | 3.69 | 3.31 |
| 8 | | 3.12 | |
| 9 | | 3.13 | |
| 10 | 60 | 3.34 | 3.44 |
| 11 | | 3.53 | |
| 12 | | - | |
| 13 | 80 | 3.05 | 3.33 |
| 14 | | 3.15 | |
| 15 | | - | |
| 16 | | 3.53 | |
| 17 | | 3.58 | |
| 18 | 100 | 1.50 | 1.38 |
| 19 | | 1.29 | |
| 20 | | 1.36 | |

ตารางที่ ข.8 พื้นที่ได้ฟีกของ PNP ที่อัตราการไหลต่างๆ

| ความเข้มข้น PNP(ppm) | พื้นที่ได้ฟีก (μC) | | | |
|-------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 0.3(mL/min) | 0.25(mL/min) | 0.20(mL/min) | 0.15(mL/min) |
| 10 | 0.86 | 1.77 | 0.68 | 1.41 |
| 20 | 1.15 | 2.63 | 1.06 | 2.17 |
| 40 | 2.32 | 4.06 | 1.89 | 3.31 |
| 60 | 2.92 | 5.22 | 2.74 | 3.44 |
| 80 | 3.77 | 6.05 | 4.10 | 3.30 |
| 100 | 3.99 | 6.43 | 5.23 | 1.38 |

ข.2.2 ผลของพีเอซีในการตรวจวัด PNP



รูปที่ ข.7 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 7.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L อัตราเร็วของตัวพา 0.3 mL/min

ตารางที่ ข.9 พื้นที่ใต้พีคของรูป ข.7

| ลำดับที่ | ความเข้มข้นของ PNP (ppm) | พื้นที่ใต้พีค (μ C) | พื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย (μ C) |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1 | 10 | 1.18 | 1.17 |
| 2 | | 1.16 | |
| 3 | 20 | 1.73 | 1.96 |
| 4 | | 2.19 | |
| 5 | 40 | 3.35 | 3.44 |
| 6 | | 3.52 | |
| 7 | 60 | 4.45 | 4.44 |
| 8 | | 4.43 | |
| 9 | 80 | 5.28 | 5.29 |
| 10 | | 5.30 | |
| 11 | 100 | 6.03 | 5.94 |
| 12 | | 5.85 | |

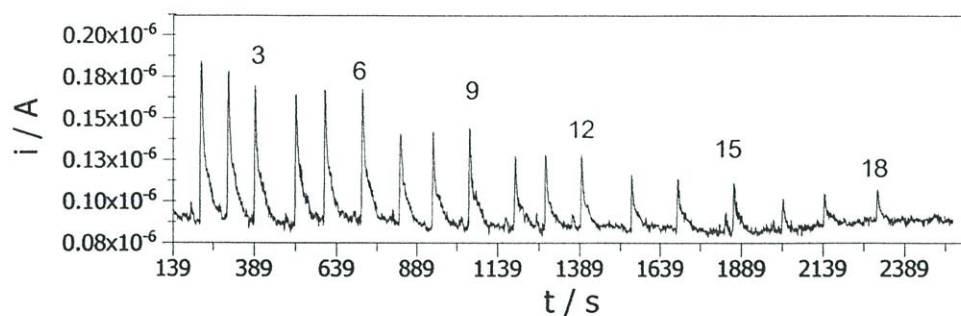
แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L อัตราเร็วของตัวพา 0.3 mL/min เช่นเดียวกับตารางที่ ข. 6

ตารางที่ ข.10 พื้นที่ได้ฟักของ PNP ที่พีเอชต่างๆของ Tris-HCl 0.1

| ความเข้มข้น PNP(ppm) | พื้นที่ได้ฟัก (μC) | | |
|-------------------------|---------------------------------|------|----|
| | 7 | 8 | 9 |
| 10 | 0.86 | 0.68 | ND |
| 20 | 1.15 | 1.06 | ND |
| 40 | 2.32 | 1.89 | ND |
| 60 | 2.92 | 2.74 | ND |
| 80 | 3.77 | 4.10 | ND |
| 100 | 3.99 | 5.23 | ND |

ND = Non detect

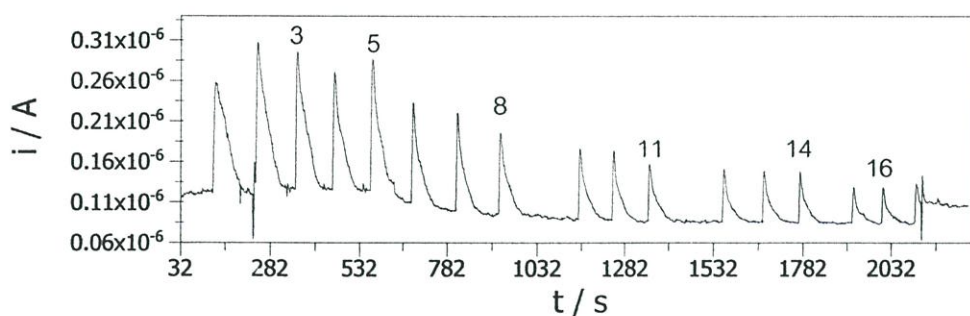
ข.2.3 ผลของปริมาตรสารตัวอย่าง



รูปที่ ข. 8 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V อัตราเร็วของตัวพา 0.2 mL/min ปริมาตรสารตัวอย่าง 10 μ L

ตารางที่ ข.11 พื้นที่ใต้พีคของรูป ข.8

| ลำดับที่ | ความเข้มข้นของ PNP (ppm) | พื้นที่ใต้พีค (μ C) | พื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย (μ C) |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1 | 100 | 1.57 | 1.40 |
| 2 | | 1.35 | |
| 3 | | 1.28 | |
| 4 | 80 | 1.30 | 1.31 |
| 5 | | 1.27 | |
| 6 | | 1.37 | |
| 7 | 60 | 1.11 | 1.05 |
| 8 | | 0.89 | |
| 9 | | 1.14 | |
| 10 | 40 | 0.72 | 0.71 |
| 11 | | 0.71 | |
| 12 | | 0.71 | |
| 13 | 20 | 0.49 | 0.50 |
| 14 | | 0.51 | |
| 15 | | 0.49 | |
| 16 | 10 | 0.22 | 0.25 |
| 17 | | 0.33 | |
| 18 | | 0.21 | |



รูปที่ ข. 9 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V อัตราเร็วของตัวพา 0.2 mL/min ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 μ L

ตารางที่ ข.12 พื้นที่ใต้พีกของรูปที่ ข.9

| ลำดับที่ | ความเข้มข้นของ PNP (ppm) | พื้นที่ใต้พีก (μ C) | พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย (μ C) |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1 | 100 | 5.59 | 5.33 |
| 2 | | 5.36 | |
| 3 | | 5.05 | |
| 4 | 80 | 3.79 | 3.85 |
| 5 | | 3.91 | |
| 6 | 60 | 2.91 | 2.73 |
| 7 | | 2.49 | |
| 8 | | 2.36 | |
| 9 | 40 | 1.81 | 1.68 |
| 10 | | 1.87 | |
| 11 | | 1.35 | |
| 12 | 20 | 1.18 | 1.17 |
| 13 | | 1.17 | |
| 14 | | 1.17 | |
| 15 | 10 | 0.47 | 0.47 |
| 16 | | 0.47 | |

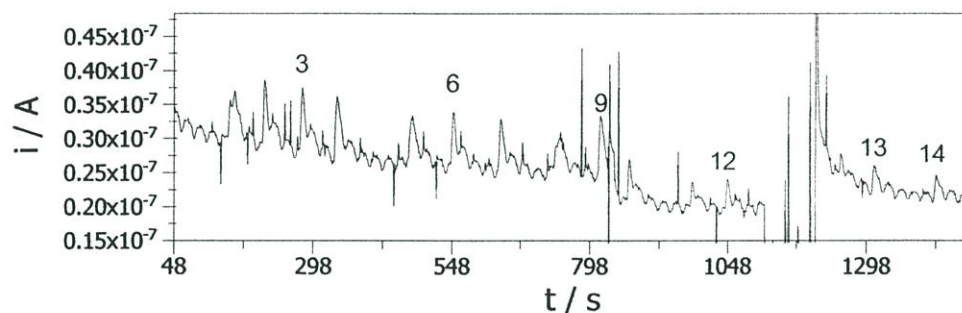
แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 อัตราเร็วของตัวพา 0.2 mL/min ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V ปริมาตรสารตัวอย่าง 30 μ L ดังรูป ข.5

ตารางที่ ข.13 พื้นที่ใต้พีคของ PNP ที่ปริมาตรสารตัวอย่าง 10, 20, และ 30 μ L

| ความเข้มข้น PNP (ppm) | พื้นที่ใต้พีค (μ C) | | |
|--------------------------|--------------------------|------------|------------|
| | 10 μ L | 20 μ L | 30 μ L |
| 10 | 0.254 | 0.470 | 0.680 |
| 20 | 0.500 | 1.173 | 1.056 |
| 40 | 0.710 | 1.675 | 1.891 |
| 60 | 1.048 | 2.583 | 2.739 |
| 80 | 1.310 | 3.851 | 4.099 |
| 100 | 1.399 | 5.335 | 5.268 |

ข.3 ผลการตรวจวัด MP ด้วยขั้วเอนไซม์ตรึงในระบบการไหลต่อเนื่อง

ข.3.1 ผลการตรวจวัด MP ด้วยขั้ว Modified

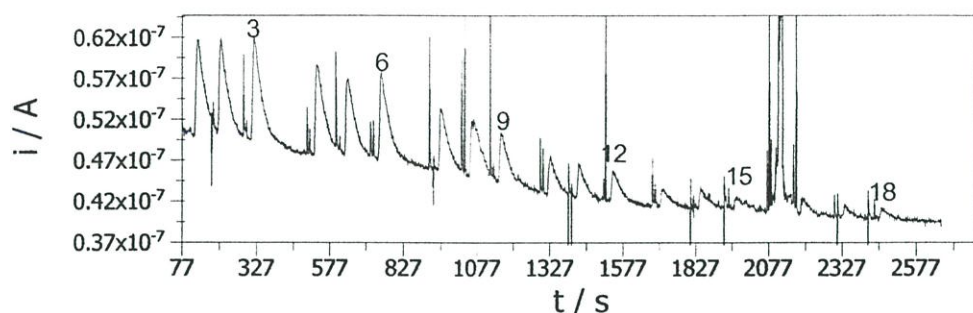


รูปที่ ข.10 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ MP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V อัตราเร็วของตัวพา 0.2 mL/min ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 μ L

ตารางที่ ข. 14 พื้นที่ใต้พีคของรูปที่ ข.10

| ลำดับที่ | ความเข้มข้นของ MP (ppm) | พื้นที่ใต้พีค (μ C) | พื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย (μ C) |
|----------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1 | 100 | 0.11 | 0.12 |
| 2 | | 0.13 | |
| 3 | | 0.13 | |
| 4 | 80 | 0.16 | 0.11 |
| 5 | | 0.11 | |
| 6 | | 0.07 | |
| 7 | 60 | 0.13 | 0.09 |
| 8 | | 0.09 | |
| 9 | | 0.06 | |
| 10 | 40 | 0.06 | 0.05 |
| 11 | | 0.04 | |
| 12 | | 0.05 | |
| 13 | 20 | 0.03 | 0.03 |
| 14 | | 0.02 | |

ข.3.2 ผลการตรวจวัด MP ด้วยหัวเอนไซม์ตรีง

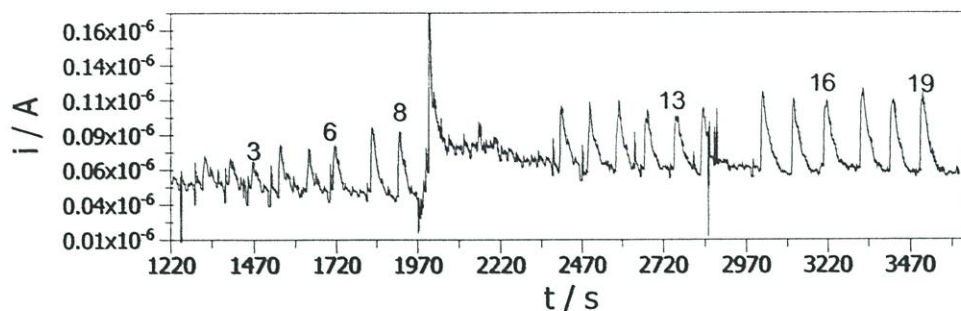


รูปที่ ข.11 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ MP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V อัตราเร็วของตัวพา 0.2 mL/min ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 μ L

ตารางที่ ข.15 พื้นที่ใต้พีกของรูปที่ ข.11

| ลำดับที่ | ความเข้มข้นของ MP (ppm) | พื้นที่ใต้พีก (μ C) | พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย (μ C) |
|----------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1 | 100 | 0.34 | 0.36 |
| 2 | | 0.37 | |
| 3 | | 0.38 | |
| 4 | 80 | 0.32 | 0.34 |
| 5 | | 0.38 | |
| 6 | | 0.31 | |
| 7 | 60 | 0.29 | 0.29 |
| 8 | | 0.28 | |
| 9 | | 0.27 | |
| 10 | 40 | 0.18 | 0.17 |
| 11 | | 0.17 | |
| 12 | | 0.15 | |
| 13 | 20 | 0.11 | 0.09 |
| 14 | | 0.09 | |
| 15 | | 0.08 | |
| 16 | 10 | 0.06 | 0.06 |
| 17 | | 0.07 | |
| 18 | | 0.05 | |
| 19 | | 0.05 | |

ข.3.3 ผลการตรวจวัด PNP ด้วยขั้วเอนไซม์ตรง



รูปที่ ข.12 แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 ศักย์ไฟฟ้า 0.95 V

อัตราเร็วของตัวพา 0.2 mL/min ปริมาตรสารตัวอย่าง 20 μ L

ตารางที่ ข.16 พื้นที่ใต้พีกของรูปที่ ข.12

| ลำดับที่ | ความเข้มข้นของ PNP (ppm) | พื้นที่ใต้พีก (μ C) | พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย (μ C) |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1 | 10 | 0.36 | 0.35 |
| 2 | | 0.35 | |
| 3 | | 0.35 | |
| 4 | 20 | 0.76 | 0.60 |
| 5 | | 0.50 | |
| 6 | | 0.55 | |
| 7 | 40 | 0.95 | 0.96 |
| 8 | | 0.97 | |
| 9 | 60 | 1.14 | 1.11 |
| 10 | | 1.18 | |
| 11 | | 1.29 | |
| 12 | | 0.95 | |
| 13 | | 0.97 | |
| 14 | 80 | 1.40 | 1.39 |
| 15 | | 1.39 | |
| 16 | | 1.39 | |
| 17 | 100 | 1.45 | 1.42 |
| 18 | | 1.40 | |
| 19 | | 1.42 | |

แอมเพอโรไวลแทมโมแกรมของ PNP โดยใช้หัวคาร์บอนเพสต์ในสภาวะที่เหมาะสมอยู่ในรูป

ข.9

ตารางที่ ข.17 ผลการวิเคราะห์ MP และ PNP ด้วยหัวชนิดต่างๆ

| ความเข้มข้นของ MP หรือ PNP (ppm) | พื้นที่ได้ฟัก (μC) | | | |
|--|---------------------------------|--|---|---------------------------------------|
| | MP with Modified electrode | MP with Immobilized enzyme electrode | PNP with Immobilized enzyme electrode | PNP with Carbon paste electrode |
| 10 | - | 0.06 | 0.35 | 0.47 |
| 20 | 0.03 | 0.09 | 0.60 | 1.17 |
| 40 | 0.05 | 0.17 | 0.96 | 1.68 |
| 60 | 0.09 | 0.29 | 1.11 | 2.58 |
| 80 | 0.11 | 0.34 | 1.39 | 3.85 |
| 100 | 0.12 | 0.36 | 1.42 | 5.34 |

ข.4 สมบัติของข้อเอนไซม์ตรีงในการตรวจวัด MP ด้วยระบบการไหลต่อเนื่อง

ข.4.1 การคำนวณหาการตอบสนองเชิงเส้น และสภาพไว

ตารางที่ ข.18 ข้อมูลการคำนวณเพื่อสร้างสมการเส้นตรงจากช่วงความเป็นเส้นตรงของข้อมูลที่ตรวจวัดได้

| MP (ppm) | พื้นที่ฟีก (μC) | $(x_i - \bar{x})$ | $(x_i - \bar{x})^2$ | $(y_i - \bar{y})$ | $(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$ |
|----------------|------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|----------------------------------|
| 0 | 0 | -35 | 1225 | -0.158 | 5.53 |
| 10 | 0.06 | -25 | 625 | -0.098 | 2.45 |
| 20 | 0.09 | -15 | 225 | -0.068 | 1.02 |
| 40 | 0.17 | 5 | 25 | 0.012 | 0.06 |
| 60 | 0.29 | 25 | 625 | 0.132 | 3.3 |
| 80 | 0.34 | 45 | 2025 | 0.182 | 8.19 |
| $\bar{x} = 35$ | $\bar{y} = 0.158$ | | $\Sigma = 4750$ | | $\Sigma = 20.55$ |

$$S_{xx} = \frac{(X_i - \bar{X})^2}{N-1} = 950$$

$$S_{xy} = \frac{(Y_i - \bar{Y})(X_i - \bar{X})}{N-1} = 4.11$$

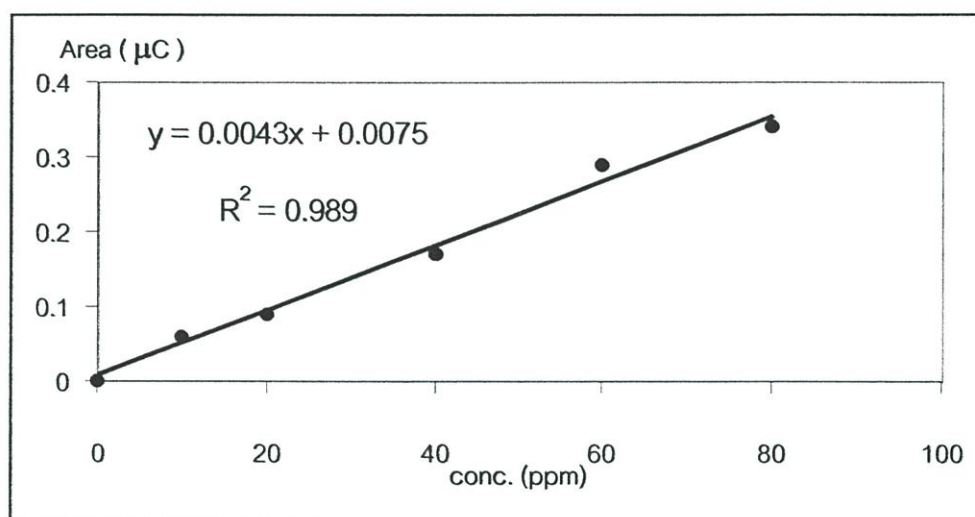
$$\text{Slope} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = 0.0043$$

$$\text{Intercept} = b = \bar{y} - m\bar{x} = 0.158 - 0.0043(35) = 0.0075$$

เพราะฉะนั้นจะหาช่วงความเป็นเส้นตรงได้จากการสร้างกราฟเส้นใหม่ได้จากตาราง ข.18

ตารางที่ ข. 19 การสร้างกราฟ linear regression จากสมการที่คำนวณได้

| MP (ppm) | พื้นที่พีค (μC) |
|----------|------------------------------|
| 0 | 0.008 |
| 10 | 0.051 |
| 20 | 0.094 |
| 40 | 0.180 |
| 60 | 0.266 |
| 80 | 0.352 |



รูปที่ ข. 13 กราฟเส้น linear regression จากสมการเส้นตรงของการตรวจวัด MP ด้วยหัวเอนไซม์ตรีง

จากรูปที่ ข. 13 ทำให้ทราบ สภาพไวจากสมการเส้นตรงซึ่งมีค่าเท่ากับ $0.0043 \mu\text{C} / \text{ppm}$ ค่า $R^2 = 0.989$ ช่วงการตอบสนองเชิงเส้นเป็นได้กว้างถึง 10 - 60 ppm และยังสามารถนำกราฟมาตรฐานดังกล่าวไปคำนวณ ค่าขีดจำกัดความเข้มข้นได้ต่อไป

ข.4.2 ขีดจำกัดในการตรวจวัด (Detection limit)

หาพื้นที่ที่ฟีกของ blank (baseline ของ Tris-HCl 0.1 M pH 8) ที่เวลา 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 วินาที อย่างละ 3 ฟีกได้ผลดังตารางที่ ข. 20

ตารางที่ ข.20 พื้นที่ฟีกของ blank ที่เวลา 200-2000 วินาที

| ครั้งที่ | พื้นที่ (μC) | ครั้งที่ | พื้นที่ (μC) | ครั้งที่ | พื้นที่ (μC) |
|----------|---------------------------|----------|---------------------------|----------|---------------------------|
| 1 | 0.021 | 11 | 0.010 | 21 | 0.014 |
| 2 | 0.021 | 12 | 0.019 | 22 | 0.019 |
| 3 | 0.026 | 13 | 0.019 | 23 | 0.009 |
| 4 | 0.026 | 14 | 0.024 | 24 | 0.009 |
| 5 | 0.016 | 15 | 0.010 | 25 | 0.009 |
| 6 | 0.016 | 16 | 0.024 | 26 | 0.018 |
| 7 | 0.015 | 17 | 0.015 | 27 | 0.013 |
| 8 | 0.010 | 18 | 0.010 | 28 | 0.013 |
| 9 | 0.025 | 19 | 0.010 | 29 | 0.024 |
| 10 | 0.029 | 20 | 0.010 | 30 | 0.013 |

ผลรวมของพื้นที่ฟีกในการวัด 30 ครั้ง $\Sigma = 0.497$

ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ฟีกในการวัด $\bar{X} = 0.016$

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของพื้นที่ฟีกในการวัด S.D = 0.0062

เมื่อนำค่า standard deviation ของแบบลงค้ที่ได้ คูณ 3 (เป็นความเชื่อมั่นที่ 95 %) เมื่อนำค่าดังกล่าวไปแทนในสมการเส้นตรงจะได้ค่าขีดจำกัดความเข้มข้นในการวิเคราะห์ดังนี้

$$y = 0.0043 + 0.0075x$$

$$x = \frac{3(0.0062) - 0.0075}{0.0043}$$

ค่าขีดจำกัดความเข้มข้นในการวิเคราะห์ = 2.58 ppm

ข.4.3 อายุการใช้งานของขั้วเอนไซม์ตรึง

ตารางที่ ข.21 พื้นที่ได้ฟีกของ MP 60 ppm ในการทดลอง 10 ครั้ง ในเวลา 1 วัน

| ครั้งที่ | พื้นที่ฟีก (μC) | | | |
|----------|------------------------------|------|------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| 1 | 2.95 | 2.90 | 2.97 | 2.94 |
| 2 | 2.93 | 2.98 | 2.92 | 2.94 |
| 3 | 2.92 | 2.86 | 2.90 | 2.89 |
| 4 | 2.86 | 2.79 | 2.84 | 2.83 |
| 5 | 2.82 | 2.84 | 2.88 | 2.85 |
| 6 | 2.86 | 2.84 | 2.84 | 2.85 |
| 7 | 2.61 | 2.6 | 2.63 | 2.61 |
| 8 | 2.45 | 2.42 | 2.45 | 2.44 |
| 9 | 2.21 | 1.96 | 2.13 | 2.10 |
| 10 | 1.68 | 1.62 | 1.67 | 1.66 |
| 11 | 1.45 | 1.43 | 1.45 | 1.44 |
| 12 | 1.30 | 1.35 | 1.29 | 1.31 |

ตารางที่ ข.22 พื้นที่ได้ฟีกของ MP 60 ppm ในการทดลอง 1 ครั้งในเวลา 7 วัน

| วันที่ | พื้นที่ฟีก (μC) $\times 0.1$ | | | |
|--------|---|------|------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| 1 | 2.95 | 2.9 | 2.97 | 2.94 |
| 2 | 2.65 | 2.59 | 2.54 | 2.59 |
| 3 | 2.43 | 2.45 | 2.40 | 2.43 |
| 4 | 2.26 | 2.30 | 2.32 | 2.29 |
| 5 | 1.56 | 1.73 | 1.65 | 1.65 |
| 6 | 1.25 | 1.23 | 1.21 | 1.23 |
| 7 | 1.10 | 1.11 | 0.99 | 1.07 |

ข.4.4 ความมีรีโพรดูซิบิลิตีในการตรึงเอนไซม์

ตารางที่ ข.23 พื้นที่ใต้พีคของการตรวจวัด MP 60 ppm ในการตรึงเอนไซม์ 5 ครั้งบนข้าวคาร์บอนเพสต์

| ครั้งที่ | พื้นที่พีค (μC) $\times 0.1$ | | | | | ค่าเฉลี่ย |
|----------|---|------|------|------|------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 1 | 2.86 | 2.89 | 2.92 | 2.85 | 2.84 | 2.872 |
| 2 | 2.56 | 2.53 | 2.51 | 2.50 | 2.54 | 2.528 |
| 3 | 2.42 | 2.46 | 2.43 | 2.41 | 2.40 | 2.424 |
| 4 | 1.91 | 1.95 | 1.97 | 1.93 | 1.96 | 1.944 |
| 5 | 1.79 | 1.68 | 1.75 | 1.78 | 1.73 | 1.746 |

ค่าเฉลี่ยในการตรวจวัด MP 60 ppm ด้วยข้าวที่ตรึงเอนไซม์ใหม่ 5 ครั้ง $\bar{X} = 2.303$

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการตรวจวัด MP 60 ppm ด้วยข้าวที่ตรึงเอนไซม์ใหม่ 5 ครั้ง S.D = 0.0062

ค่าความมีรีโพรดูซิบิลิตีในการตรวจวัด MP 60 ppm ด้วยข้าวที่ตรึงเอนไซม์ใหม่ 5 ครั้ง % RSD = 19.75

ประวัติผู้เขียน

นางสาวกนกวรรณ ฤดีศิริศักดิ์ เกิดเมื่อวันที่ 29 มกราคม พ.ศ. 2518

- ปี พ.ศ. 2540 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ศึกษาศาสตร์) เอกเคมี จากมหาวิทยาลัย
สงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

- ปี พ.ศ. 2540 รับราชการกระทรวงศึกษาธิการ ณ สถาบันวิจัยเคมี สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

- ปี พ.ศ. 2543 ลาศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเคมี (เคมีวิเคราะห์)
ณ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

- ปี พ.ศ. 2547 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเคมี (เคมีวิเคราะห์)
ณ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง