

สนใจ เติบโตครั้ง : การใช้ประโยชน์ของการกระตุ้นอัลโลสเทอริกเอนไซม์สำหรับ
เทคนิคแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนซิงขั้นสูง (UTILIZATION OF ALLOSTERIC
ENZYME ACTIVATION FOR ADVANCED AMPEROMETRIC BIOSENSING).
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิดา ชันแก้วหล้า, 160 หน้า.

ไบโอเซนซิง แอมเพอโรเมตริกขั้นสูง เอนไซม์อัลโลสเทอริก พารา-ไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตต
ส่วนประกอบ HPAH-รีดักเตส ตัวบ่งชี้ภาวะการเกิดโรค

อัลโลสเทอริกเอนไซม์แบบกระตุ้นสามารถเพิ่มอัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นในรูปแบบที่
ขึ้นกับความเข้มข้น เป็นที่แน่ชัดว่าอัลโลสเทอริกแบบกระตุ้นนี้น่าสนใจสำหรับงานทาง
เทคโนโลยีชีวภาพ เพราะสัมพันธ์กับการให้ผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นปริมาณมาก ซึ่งจะส่งผลให้
ประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตดีกว่า สำหรับเทคนิคแอมเพอโรเมตริกเอนไซม์ไบโอเซนซิงนั้น
จะช่วยให้การขยายสัญญาณและการตรวจวัดของสารตั้งต้นหรือตัวกระตุ้นดีขึ้น ดังนั้นการทำให้
เทคนิคแอมเพอโรเมตริกไบโอเซนซิงขั้นสูงเพื่อตรวจวัดสารตั้งต้นและตัวกระตุ้นเอนไซม์เกิดขึ้น
ได้จริง จึงเป็นวัตถุประสงค์หลักของงานในวิทยานิพนธ์เคมีเชิงวิเคราะห์ระดับปริญญาเอกนี้
สำหรับโมเลกุลที่ใช้ในการกระตุ้นนี้กำลังเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นตัวบ่งชี้ภาวะการเกิดโรคที่มี
ศักยภาพ

เอนไซม์ที่ถูกนำมาศึกษาในงานวิจัยนี้คือ เอนไซม์รีดักเตส จากแบคทีเรียชื่อ *Acinetobacter
baumannii* ซึ่งส่วนประกอบ รีดักเตส C1 ซึ่งพบว่าสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น NADH ให้เป็น NAD^+
และปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้นเมื่อมีตัวกระตุ้น พารา-ไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตต (*p*-HPA) ซึ่งในทาง
การแพทย์ *p*-HPA เป็นโมเลกุลที่สำคัญในการเป็นตัวบ่งชี้ภาวะการเกิดโรคและการเพิ่มขึ้นของ
โมเลกุลนี้ในปัสสาวะสามารถบ่งบอกความไม่สมดุลของแบคทีเรียในระบบย่อยอาหารและ โรค
ทางสมองต่าง ๆ

เนื่องจากเอนไซม์รีดักเตส C1 ต้องการวัฏจักรการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์อย่างมีประสิทธิภาพ
สำหรับวัฏจักรการเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพของ NADH ซึ่งโดยปกติเกิดจากการทำปฏิกิริยากับ
ออกซิเจนที่ละลายในสารละลาย ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงจากการทำงานอย่างต่อเนื่องของ เอนไซม์รีดัก
เตส C1 ที่สามารถตรวจวัดได้คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนั้นไบโอเซนเซอร์แบบตรงใน
ตัวกลางรีดอกซ์เทียมอาจถูกนำมาใช้กับ C1 สำหรับการสร้างวัฏจักรปฏิกิริยารีดอกซ์และการ
ตรวจวัด ซึ่งกรอบงานของวิทยานิพนธ์นี้ที่ประสบผลสำเร็จคู่ลง คือ

- C1 แอมเพอโรเมตริกไบโอเซนซิงของ NADH และ *p*-HPA โดยเอนไซม์จะทำ
ปฏิกิริยากับ สารตั้งต้น ออกซิเจน และ ตัวกระตุ้นในสารละลาย โดยมีขั้วไฟฟ้า

แคโทดแบบสกรีน ปริ้นท์ที่เคลือบด้วย Prussian Blue ทำหน้าที่ในการหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดจากปฏิกิริยา

- C1 แอมเพอโรเมตริกไบโอเซนซิงของ NADH และ *p*-HPA แบบตรึงเอนไซม์ภายในรีดอกซ์โพลีเมอร์ออสเมียม (Os^{3+}) เพื่อใช้หาปริมาณ NADH ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี การกระตุ้นแบบอัลโลสเทอริก ผ่านการถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่าง Os^{2+} และ Os^{3+} ที่ขั้วไฟฟ้า
- การประยุกต์ใช้ออสเมียม C1 ไบโอเซนเซอร์ สำหรับตรวจสอบหาปริมาณของ *p*-HPA ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ภาวะการเกิดโรคในตัวอย่างที่ทราบค่าและในปัสสาวะเทียม

ผลสัมฤทธิ์ข้างต้นกล่าวได้ว่าเป็นพื้นฐานของการวิเคราะห์ *p*-HPA ในปัสสาวะอย่างง่ายและราคาถูก ซึ่งอาจถูกผสมผสานเข้ากับขั้วไฟฟ้าแบบสกรีนปริ้นท์ในอุปกรณ์แลอซุภาพ เช่น ที่ใช้ตรวจวัดระดับกลูโคส สำหรับพกพาและตรวจสอบได้ด้วยตัวเอง



สาขาวิชาเคมี
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนักศึกษา สมใจ เข็มพุดกาว
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา R S
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Albert Schults

SOMJAI TEANPHONKRANG : UTILIZATION OF ALLOSTERIC
ENZYME ACTIVATION FOR ADVANCED AMPEROMETRIC
BIOSENSING. THESIS ADVISOR :
ASST. PROF. PANIDA KHUNKAEWLA, Ph.D. 160 PP.

BIOSENSING, ADVANCED AMPEROMETRY, ALLOSTERIC ENZYME,
P-HYDROXYPHENYLACETATE, HPAH-REDUCTASE COMPONENT, DISEASE
BIOMARKERS

Activating allosteric enzyme modulation can trigger a concentration-dependent rise in biocatalytic substrate conversion rates. Clearly, allosteric activation is attractive for biotechnology, since related larger product yields will give better process productivity. For amperometric enzyme biosensing, an increased protein biocatalysis facilitates signal amplification and thus improved detection of substrate and/or effector. Realization of advanced amperometric substrate and enzyme effector biosensing for an activating molecule that was, at the same time, appealing as a potential disease biomarker, was actually the main objective of this thesis work.

The enzyme system explored in this project was a well-studied bacterial reductase, namely *Acinetobacter baumannii* C1 that had been shown to convert NADH into NAD⁺ and to react faster in the presence of effector *p*-hydroxy-phenylacetate (*p*-HPA). From the medical point of view, it was important that *p*-HPA has relevance as a disease biomarker, in that its urinary elevation is, for instance, reported as a sign of a critical bacterial imbalance in the digestion system on various brain pathologies, too.

As reductase, C1 needs efficient redox recycling for cyclic NADH biocatalysis, which usually is reached via reaction with dissolved oxygen. A side product of continuous C1 action is then detectable, hydrogen peroxide, H_2O_2 . In immobilized biosensor configurations artificial redox partners may be offered to C1 for redox recycling and sensing. Within this frame work, the practical thesis work successfully accomplished:

- C1-based amperometric NADH and *p*-HPA biosensing, with the enzyme reacting in solution with substrate, O_2 and effector and cathodic Prussian blue-modified screen-printed electrodes in charge of quantification of liberated H_2O_2 .
- C1-based amperometric NADH and *p*-HPA biosensing, with the enzyme fixed in an Osmium (III)-based redox polymer and biocatalysis quantified with and without allosteric activation via Os (II)/(III) redox transfer at the electrode.
- Application of Os (III) redox polymer/C1 biosensors for the quantification of traces of the disease biomarker *p*-HPA in model and artificial urine samples.

The above achievements are seen as the foundation of a simple and cheap urinary *p*-HPA analysis that may be integrated on screen-printed electrode platforms into glucose meter-type portable healthcare devices, and as such serve for personal home inspections.

School of Chemistry

Academic Year 2018

Student's Signature Somjai Teanphonkrang

Advisor's Signature R

Co-advisor's Signature Albert Schulke