Thesis Title Property Improvement and Characterization of Silk Fibroin Membranes for Glucose Biosensor Fabrication

Author Mr. Piyarut Moonsri

Degree Doctor of Philosophy (Chemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Ruangsri Watanesk	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Surasak Watanesk	Member
Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup	Member

ABSTRACT

In this thesis, stable silk fibroin membranes were prepared by modification of silk fibroin solution derived from silk (*Bombyx mori*) waste with a low molecular weight crosslinking agent, polyethylene glycol diglycidyl ether (PEGDE) in order to improve silk fibroin membrane properties in applying for fabrication of an amperometric glucose biosensor.

The preparation of the modified-silk-fibroin membrane was carried out by adding PEGDE into the silk fibroin solution to give PEGDE at the concentrations of 2-10% v/v. Then the solutions were left at 60^0C in polystyrene trays until the membranes were obtained. The resulting membranes exhibited a translucent appearance. The membranes surfaces were studied by atomic force microscopy and found that their

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

roughness increased as the PEGDE concentration increased. The cross-sectional membranes surfaces were then studied by scanning electron microscopy which found that the membrane of silk fibroin modified with 4% PEGDE resulted in a higher porosity than other concentrations. Secondary protein structure of the membranes, characterized by fourier transform infrared spectroscopy, showed the predominantly β-sheet structure inside the modified-silk-fibroin membranes. A study of membrane water solubility by ultraviolet-visible spectroscopy demonstrated that the modified-silk-fibroin membranes with the PEGDE higher than 4% were largely insoluble within the pH range of 4-10. Whereas, water absorbability of the membranes increased as the amounts of PEGDE increased up to 4%. Form the evaluation of mechanical properties of the modified-silk-fibroin membranes, it was found that the modification of silk fibroin solution with PEGDE could improve pliability and tenacity of the modified-silk-fibroin membranes.

An amperometric glucose biosensor was constructed by attaching the glucose oxidase immobilized membranes, of which the fibroin was modified under different conditions, onto a Prussian Blue film deposited on an Au electrode. The electrochemical cell system used comprised of the glucose oxidase electrode as a working electrode coupled with the Ag/AgCl reference electrode and Pt wire as an auxiliary electrode. The response characteristics of the biosensors under optimal condition in phosphate buffer media were studied and found that the optimal conditions for glucose determination with highest sensitivity and without interfering effect were at pH 7.0, -100 mV, and 40 ^{0}C. The biosensor based on the modified-silk-fibroin membrane with 4% PEGDE showed the highest performance compared to others by giving a response within 3 s and exhibiting a linear response to glucose concentration in range of 0.2-1.4 mM with a detection limit of 10^{-2} mM. The study of kinetic behavior of the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

electrode demonstrated the calculated apparent Michaelis-Menten constant and the maximum current response were found to be 3.51 mM and 4.31 μA, respectively. Moreover, the fabricated electrode also exhibited good reproducibility and retained 74% of its initial sensitivity after 2 weeks of soaking in phosphate buffer at $4\ ^{0}$C.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงสมบัติและการหาลักษณะเฉพาะของเมมเบรนของไฟโบรอินจากไหมเพื่อการประดิษฐ์กลูโคสไบโอเซนเซอร์

ผู้เขียน นายปิยรัตน์ มูลศรี

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. เรืองศรี วัฒเนสก์	ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. สุรศักดิ์ วัฒเนสก์	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์	กรรมการ

บทคัดย่อ

ในวิทยานิพนธ์นี้ ได้เตรียมไฟโบรอินเมมเบรนที่เสถียรจากไหมโดยการดัดแปรสารละลายไฟโบรอินที่เตรียมจากเศษไหมพันธุ์ *บอมบิกซ์ มอริ* ด้วยสารเชื่อมไขว้ พอลิเอทิลีนไกลคอลไดไกลซิดิลอีเธอร์ (พีอีจีดีอี) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เพื่อปรับปรุงสมบัติของไฟโบรอินเมมเบรน ในการนำไปประยุกต์เพื่อการประดิษฐ์กลูโคสไบโอเซนเซอร์แบบแอมเพอร์โรเมตริก

การเตรียมเมมเบรนของไฟโบรอินดัดแปร ทำโดยการเติมพีอีจีดีอี ลงในสารละลายไฟโบรอินให้ได้ความเข้มข้น 2-10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากนั้นทิ้งไว้ในถาดพอลิสไตรีนจนได้เมมเบรนที่อุณหภูมิ 60^{O}ซ จากการสังเกตลักษณะของเมมเบรนที่เตรียมได้ พบว่ามีสภาพโปร่งแสง เมื่อตรวจสอบพื้นผิวของเมมเบรนด้วยอะตอมมิกฟอร์ซไมโครสโกปี พบว่ามีความขรุขระมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของพีอีจีดีอีเพิ่มขึ้น ต่อจากนั้นได้ศึกษาพื้นผิวภาคตัดขวางของเมมเบรนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเมมเบรนของไฟโบรอินที่ดัดแปรด้วยพีอีจีดีอี 4 เปอร์เซ็นต์ มีความพรุนมากที่สุด จากการตรวจสอบลักษณะเฉพาะของโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิของไฟโบรอินในเมมเบรนด้วยฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี แสดงให้เห็นถึงสภาพโครงสร้างแบบเบต้า-ชีทเกิดขึ้นในเมมเบรนของไฟโบรอินที่ดัดแปร เมื่อศึกษาการละลายน้ำของเมมเบรนด้วยวิธีอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี พบว่าเมมเบรนของไฟโบรอินดัดแปรที่มีเปอร์เซ็นต์ของพีอีจีดีอี มากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ จะไม่ค่อยละลายน้ำในช่วงพีเอช 4-10 โดยที่การดูดซึมน้ำของเมมเบรนจะเพิ่มขึ้นเมื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณพีอีจีดีอีเพิ่มขึ้นจนถึง 4 เปอร์เซ็นต์ จากการประเมินสมบัติเชิงกลของเมมเบรนของไฟโบรอินดัดแปร พบว่าการดัดแปรสารละลายไฟโบรอินด้วยพีอีจีดีอี สามารถช่วยปรับปรุงความยืดหยุ่นและความเหนียวของเมมเบรนได้

ได้สร้างแอมเพอร์โรเมตริกกลูโคสไบโอเซนเซอร์ โดยการนำเมมเบรนที่ดัดแปรไฟโบรอินด้วยเงื่อนไขต่าง ๆ มาตรึงด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส แล้วนำมายึดติดบนอิเล็กโทรดทองที่เคลือบผิวด้วยฟิล์มปรัสเซียนบลู ซึ่งระบบของเซลล์ไฟฟ้าเคมีที่ใช้นี้ มีอิเล็กโทรดที่ตรึงด้วยเอนไซม์กลูโคส-ออกซิเดสเป็นอิเล็กโทรดทำงานร่วมกับ อิเล็กโทรดอ้างอิงซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์และลวดแพลทินัมเป็นอิเล็กโทรดช่วย เมื่อทำการศึกษาการตอบสนองสัญญาณของไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดกลูโคสในระบบฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณกลูโคส ที่ให้ความไวต่อการวัดสูงสุดและไม่มีอิทธิพลจากสารรบกวนคือที่ พีเอช 7.0 และใช้ศักย์ไฟฟ้าในการตรวจวัด -100 มิลลิโวลต์ ที่อุณหภูมิ 40^{O}ซ ไบโอเซนเซอร์ที่ใช้เมมเบรนของไฟโบรอินดัดแปรด้วยพีอีจีดีอี 4 เปอร์เซ็นต์ แสดงสมรรถนะในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสดีที่สุด โดยใช้เวลาให้สัญญาณตอบสนองได้ภายใน 3 วินาที และยังแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นต่อการตอบสนองในช่วงความเข้มข้นของกลูโคส 0.2-1.4 มิลลิโมลาร์ โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 10^{-2} มิลลิโมลาร์ เมื่อศึกษาพฤติกรรมของอิเล็กโทรดเชิงจลนศาสตร์ พบว่ามีค่าคงที่ไมเคลลิส-เมนเทนและกระแสสูงสุดที่คำนวณได้เท่ากับ 3.51 มิลลิโมลาร์ และ 4.31 ไมโครแอมแปร์ตามลำดับ นอกจากนั้นอิเล็กโทรดที่เตรียมได้ยังแสดงให้เห็นถึงผลทดลองซ้ำได้ดีและยังคงสภาพไวสูงถึง 74 เปอร์เซ็นต์ จากค่าเริ่มต้นภายหลังจากการแช่ทิ้งไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 2 อาทิตย์ที่อุณหภูมิ 4 ^{O}ซ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved