อุษา ย้อนโคกสูง 2551: การศึกษาลักษณะและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ลินามาเรส ที่ได้จากน้ำยางมันสำปะหลัง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์กล้าณรงค์ ศรีรอต, Dr.Ing. 125 หน้า

เอนไซม์ลินามาเรส (E.C.3.2.1.21) จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มบีต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบลินามาริน ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกไซยาโนเจนิก กลูโคไซด์ที่เป็นพิษ และพบทั่วไปในมันสำปะหลัง ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแยกเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนของน้ำยางจากใบมันสำปะหลังให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยใช้น้ำยางที่มีเอนไซม์ดิบ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 21.28 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ทำการแยกเอนไซม์จากน้ำยางของมันสำปะหลัง โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต กับวิธีผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose พบว่าได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ขึ้น 1.21 และ 2.98 เท่า ตามลำดับ มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 25.71 และ 63.33 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

เมื่อศึกษาสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 4 ชนิด คือ เอนไซม์ดิบ, เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟ แบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose และเอนไซม์ทางการค้า (Linamarase™) พบว่า เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose จะมีความบริสุทธิ์เช่นเดียวกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิส (SDS-PAGE) และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 70 กิโลดาลตัน ในขณะที่เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นยังไม่บริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 4 ชนิดจะคล้ายคลึงกัน คือที่ 60 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมินี้เอนไซม์ ลินามาเรสจะมีความเสถียรลดลง เมื่อทดสอบด้วย *p*-nitrophenyl -β-D-glucopyranoside ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรส คือ 7.0 ซึ่งที่ความเป็นกรดเป็นด่างนี้เอนไซม์มีความคงตัวที่ดี รวมทั้งในสภาวะที่เป็นกรด (pH >3.5) และด่าง (pH <9.0)

เมื่อนำเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมาใช้ในงานวิเคราะห์ เปรียบเทียบกับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้า โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ทั้งหมดในส่วนเนื้อและเปลือกของหัวมันสำปะหลัง ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังต้ม ผลิตภัณฑ์ฟลาวและแป้งมันสำปะหลัง (อย่างละ 5 ตัวอย่าง) พบว่า เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose จะให้ผลเทียบเท่ากับเอนไซม์ลินามาเรสทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในขณะที่เอนไซม์ดิบและเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จะสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไซยาไนด์ในตัวอย่างบางประเภทได้โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับเอนไซม์ทางการค้า

Usa Yonkoksung 2008: Characterization and Purification of Linamarase from Cassava Latex. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Klanarong Sriroth, Dr. Ing. 125 pages.

Linamarase (E.C.3.2.1.21) is a β-glucosidase enzyme, capable to hydrolyze linamarin, a toxic cyanogenic glucoside compound naturally occurred in cassava. In this work, purification and characterization of linamarase from cassava latex, being collected from petiole were studied. The specific activity of crude linamarase from the latex was 21.28 unit/mg protein and used for further purification by 2 different methods, i.e. salt precipitation (60 % $(NH_4)_2SO_4$) or anion exchange chromatography using DEAE-cellulose (pH 6.0), yielding the enzyme with increased specific activities by 1.21 and 2.98 folds, respectively. When compared with the commercially available enzyme (Linamarase™), only the enzyme obtained from anion exchange chromatography with the molecular weight size of 70 kDa was pure, as determined by SDS-PAGE electrophoresis. The optimum temperature, as determined by using *p*-nitrophenyl-β-D-glucoside (pNPG), of all tested enzymes incliuding crude, purified by salt precipitation, purified by anion exchange chromatography and the commercial ones was similar, i.e. at 60°C. However, the enzymes were not stable at that high temperature. All tested enzymes showed the highest activity at pH 7.0 when evaluated by *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside and the enzymes were quite stable in acidic (pH > 3) and alkali (pH < 9) conditions.

Three enzymes, i.e. crude, purified by salt precipitation and purified by anion exchange chromatography were used to determine the total cyanide contents of cassava samples including peels and parenchyma of fresh roots, boiled roots, flour and starch (5 samples each) and compared with the commercial one for analytical purpose. The results suggested that purified enzymes by anion exchange chromatography provided the most equivalent comparable results as the commercial enzymes ($p \leq 0.05$).Yet, in some samples both crude and purified enzymes by salt precipitation were still applicable for analytical works as the analytical results were not significantly different ($p \leq 0.05$).