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 อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสทั้ง 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

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ