การสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรส จากเนื้อมันสำปะหลังสายพันธุ์ KU-50

สมพิศ สอนโยธา [1] คิน เลย์ คู [2] และ กนก รัตนะกนกชัย [3*]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

รับเมื่อ 12 พฤศจิกายน 2550 ตอบรับเมื่อ 12 พฤษภาคม 2551

บทคัดย่อ

ลินามารินจากเปลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ KU-50 ถูกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยกรดซัลฟูริกเย็น (0.25 โมลาร์) และแยกด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ NH_2 Lichrospher 100 ขนาด 4 x 250 มม. สองครั้ง โดยใช้ acetronitrile 70% (v/v) และ 80% (v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์โดย thin layer chromatography (TLC) และได้สกัด crude linamarase จากเนื้อมันสำปะหลังสายพันธุ์เดียวกันด้วยบัฟเฟอร์ 4 ชนิด ได้แก่ Buffer A [polyvinylpyrrolidone K30 (PVP) 1% (w/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0] Buffer B [PVP 1% (w/v) และ Triton X-100 1% (v/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0] Buffer C [PVP 1% (w/v) และ Tween 20 1% (v/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0] และ Buffer D [PVP 1% (w/v) และ Tween 80 1% (v/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0] พบว่า Buffer C ให้ประสิทธิภาพดีที่สุด เมื่อนำ crude linamarase ที่สกัดด้วย Buffer C มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสบริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 65 กิโลดาลตัน และลินามาเรสบริสุทธิ์นี้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 50 °C และมีเสถียรภาพต่อพีเอชและอุณหภูมิในช่วงกว้างระหว่าง 4.0-7.0 และ 30-60 °C ตามลำดับ สำหรับ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) นั้นพบว่าไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามกิจกรรมของลินามาเรสถูกทำให้เพิ่มขึ้นด้วย Na^+, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+} และ Mg^{2+} ในขณะที่ถูกยับยั้งเพิ่มขึ้นด้วย Fe^{3+} และ Cd^{2+}

คำสำคัญ : มันสำปะหลังสายพันธุ์ KU-50 / การสกัดเอนไซม์ลินามาเรส / Hydrophobicity / การทำให้เอนไซม์ลินามาเรสบริสุทธิ์ / ลินามาริน

---

* *Corresponding author: E-mail: khanok.rat@kmutt.ac.th*

1 นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

2 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

3 รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

Extraction, Purification and Characterization of Linamarase from Cassava Root Parenchyma of the High-cyanogen Cultivar KU-50

Somphit Sornyotha [1], Khin Lay Kyu [2], and Khanok Ratanakhanokchai [3*]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Takham, Bangkhuntien, Bangkok 10150

Received 12 November 2007 ; accepted 12 May 2008

Abstract

Linamarin from cassava peel KU-50 cultivar was extracted and purified by 0.25 M chilled H_2SO_4 and two steps in high-performance liquid chromatography (HPLC) using NH_2 Lichrospher 100 column (size 4 x 250 mm) and 70% (v/v) and 80% (v/v) acetonitrile as the mobile phase, respectively. Then, it was detected the purity by thin layer chromatography (TLC). Crude linamarase was extracted from cassava root parenchyma with buffer A [0.1 M phosphate buffer pH 6.0 containing 1% polyvinylpyrrolidone K30 (PVP)], buffer B [0.1 M phosphate buffer pH 6.0 containing 1% PVP and 1% Triton X-100], buffer C [0.1 M phosphate buffer pH 6.0 containing 1% PVP and 1% Tween 20] and buffer D [0.1 M phosphate buffer pH 6.0 containing 1% PVP and 1% Tween 80]. The results showed that buffer C is the highest ability for extraction of linamarase from cassava parenchyma tissue. The linamarase was then precipitated and purified by ammonium sulfate precipitation and DEAE-Toyopearl column, respectively. The molecular weight of the purified linamarase was estimated to be about 65 kDa. The optimum pH and temperature for linamarase were pH 7.0 and 50 °C, respectively. The purified linamarase was stable in the broad pH range of 4.0 to 7.0 and 30 to 60 °C. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was not affect slightly on the activity of the purified enzyme. However, linamarase activity was increased with Na^+, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+} and Mg^{2+} while it was strongly inhibited by Fe^{3+} and Cd^{2+}.

Keywords : Cassava Root KU-50 cultivar / Extraction of Linamarase / Hydrophobicity / Purification of Linamarase / Linamarin

* *Corresponding author: E-mail: khanok.rat@kmutt.ac.th*

[1] *Graduate Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[2] *Assistant Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[3] *Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

1. บทนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) มีสารประกอบไซยาโนจีนิคกลูโคไซด์ (Cyanogenic glucoside) ที่พบมากอยู่สองชนิดคือ ลินามาริน (linamarin) และโลทอสตราลิน (lotaustralin) ในอัตราส่วน 97:3 [1] นอกจากนี้ในมันสำปะหลังยังมีเอนไซม์ลินามาเรส (linamarase; EC 3.2.1.21) ซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบไซยาโนจีนิคกลูโคไซด์อยู่ด้วย โดยเอนไซม์และสับสเตรทจะแยกกันอยู่คนละส่วนของเซลล์ [2-3] ซึ่งในสภาพปกติจะไม่มีการทำปฏิกิริยากันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท แต่เมื่อเซลล์ถูกทำลายโดยการบดขยี้ หรือทำลายด้วยวิธีต่างๆ กระบวนการย่อยสลายสารประกอบไซยาโนจีนิคกลูโคไซด์จะเกิดขึ้นจนได้ไฮโดรเจนไซยาไนด์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นพิษและเกิดขึ้นเพื่อป้องกันตนเองจากเหล่าศัตรูพืช

ปัจจุบันมีการนำลินามาเรสไปประยุกต์ใช้ เช่น ใช้ในชุด kit หรือใช้ทำ probe สำหรับตรวจวัดปริมาณไซยาไนด์ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มาจากมันสำปะหลัง หรืออาจใช้ในการกำจัดสารประกอบไซยาโนจีนิคกลูโคไซด์ที่หลงเหลืออยู่ในแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งจะใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์ยา [4-5] แม้ว่าจะมีการศึกษาวิธีการสกัดเอนไซม์ลินามาเรสจากส่วนต่างๆ ของมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ เช่น จากส่วนใบ เปลือกและเนื้อของสายพันธุ์ Merah Jambu จากส่วนใบ ลำต้น เปลือก และเนื้อของสายพันธุ์ M4 H1687 H165 และ H226 แต่กระบวนการสกัดส่วนใหญ่มักเป็นแบบ hydrophilic extraction [6-7] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในส่วนเปลือกมันสำปะหลังมีปริมาณลินามารินอยู่สูงกว่าในส่วนของเนื้อมันสำปะหลัง [7] ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการสกัดและทำให้ลินามารินจากเปลือกมันสำปะหลังบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรส และหาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดลินามาเรสจากเนื้อมันสำปะหลังสายพันธุ์ KU-50 โดยปรับปรุงวิธีการสกัดให้มีความเป็น hydrophobicity เพิ่มมากขึ้น ซึ่งมันสำปะหลังสายพันธุ์ KU-50 เป็นสายพันธุ์ที่นิยมเพาะปลูกกันมากในประเทศไทยและเป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูง (high-cyanogen cultivar) โดย Sornyotha และคณะ [8] ตรวจพบปริมาณลินามารินในเปลือกและเนื้อมันสำปะหลังได้สูงถึง 7.71 ± 0.97 และ 5.77 ± 0.74 ก./กก. (น้ำหนักสด) ตามลำดับ และเนื่องจากในปัจจุบันการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของลินามาเรสจากส่วนของเนื้อมันสำปะหลังยังมีข้อมูลไม่มากนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จะศึกษาการทำให้ลินามาเรสที่สกัดจากเนื้อมันสำปะหลังสายพันธุ์ KU-50 บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ลินามาเรสด้วย

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 วัตถุดิบ

งานวิจัยนี้ใช้มันสำปะหลังสดสายพันธุ์ KU-50 อายุ 12 เดือน ซึ่งเก็บเกี่ยวจากศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดระยอง หัวมันสำปะหลังสดทั้งหมดจะถูกล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปาแล้วทำการแยกเปลือกออกจากเนื้อ หลังจากนั้นหั่นส่วนเปลือกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.2 ลบ.ซม. และเนื้อขนาดประมาณ 1 ลบ.ซม จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2 การสกัดลินามารินจากเปลือกมันสำปะหลัง

ลินามารินจากเปลือกมันสำปะหลังถูกสกัดโดยดัดแปลงวิธีการของ Cooke [9] โดยการปั่นเปลือกมันสำปะหลังที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ 100 ก. ในกรดซัลฟูริกเย็น (4 °C) ที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ปริมาตร 200 มล. เป็นเวลา 15 วินาที ที่ความเร็วต่ำ ตามด้วยการปั่นที่ความเร็วสูงอีกสองครั้งๆ ละ 1 นาที ด้วยเครื่องปั่น Moulinex DAE1 และหยุดพักครั้งละ 1 นาที เพื่อลดความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างการปั่น จากนั้นแยกสารละลายส่วนใสออกโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 4 ตามด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้คือ crude linamarin ซึ่งจะถูกทำให้บริสุทธิ์และใช้เป็นสับสเตรทสำหรับตรวจสอบกิจกรรมของลินามาเรสต่อไป

2.3 การทำให้ลินามารินบริสุทธิ์

Crude linamarin ถูกทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Sornyotha และคณะ [8] โดยใช้เครื่อง HPLC รุ่น C-R1A Chromatopac (Shimadzu) ซึ่งต่อกับคอลัมน์ NH_2 Lichrospher 100 (Hewlett Packard) ขนาด 4 x 250

มม. โดยใช้ acetonitrile ความเข้มข้นร้อยละ 70 (v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ด้วยอัตราการไหล 1.0 มล./นาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C และใช้ Refractomonitor-IV RI (LDC Analytical) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดความเข้มข้นของลินามาริน ลินามารินที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์นี้ถูกทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นอีกครั้งด้วย HPLC ที่สภาวะเดียวกับข้างต้น แต่ใช้ acetonitrile ความเข้มข้นร้อยละ 80 (v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ด้วยอัตราการไหล 0.5 มล./นาที และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของลินามารินด้วยเทคนิค TLC [8] โดยใช้ลินามารินทางการค้า (A.G. Scientific, Biochemical Manufacturer) เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำสารละลายลินามารินที่บริสุทธิ์ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer (FreeZone, Labconco) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.4 การตรวจวัดลินามารินด้วย TLC

ลินามารินที่ผ่านการแยกด้วย HPLC สองครั้งจะถูกตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC [8] โดยหยดสารละลายตัวอย่างให้เป็นจุดเล็กๆ บนแผ่น TLC (silica gel 60, F_{254} plate จากบริษัท Merck) และแช่แผ่น TLC ใน developing solvent ที่ประกอบด้วย n-butanol : acetic acid: distilled water = 50 : 25 : 25 (by volume) โดยให้ solvent เคลื่อนที่ขึ้นไปประมาณ ¾ ของแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ออกมาวางทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และตรวจดูตำแหน่งของลินามารินโดยเปรียบเทียบกับลินามารินทางการค้า โดย spray plate ด้วยสารละลายผสมระหว่าง α-diphenylamine: สาร ละลายผสม = 1: 58.5 (w/v) ซึ่งสารละลายผสมประกอบด้วย aniline: acetone: ร้อยละ 80 H_3PO_4 = 1: 50: 7.5 (by volume) และอบที่อุณหภูมิ 105 °C จนกระทั่งสามารถ สังเกตเห็นตำแหน่งของสารที่เกิดขึ้น

2.5 การสกัดลินามาเรสจากเนื้อมันสำปะหลัง

ลินามาเรสจากเนื้อมันสำปะหลังถูกสกัด โดยดัดแปลงวิธีการของ Nambisan และ Sundaresan [7] โดยปั่นเนื้อมันสำปะหลังที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยเครื่องปั่นร่วมกับ Buffer A [PVP (Fluka) ร้อยละ 1 (w/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0] Buffer B [PVP ร้อยละ 1 (w/v) และ Triton-X 100 ร้อยละ 1 (v/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0] Buffer C [PVP ร้อยละ 1 (w/v) และ Tween 20 ร้อยละ 1 (v/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0] หรือ Buffer D [PVP ร้อยละ 1 (w/v) และ Tween 80 ร้อยละ 1 (v/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0] โดยใช้อัตราส่วนเนื้อมันสำปะหลัง 300 กรัมต่อบัฟเฟอร์แช่ เย็นที่ 4 °C 600 มล. ปั่นเนื้อมันสำปะหลังให้ละเอียดสองครั้ง ๆ ละ 30 วินาที และหยุดพักครั้งละ 1 นาที เพื่อลดความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างการปั่น จากนั้นแยกสารละลาย ส่วนใสออกโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 4 ตามด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสไป dialysis ด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง เพื่อขจัด PVP Triton-X 100 Tween 20 หรือ Tween 80 ออก แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้ซึ่งเป็น crude enzyme เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.6 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ลินามาเรส

การตรวจสอบกิจกรรมของลินามาเรส ใช้วิธีการของ O'Brien และคณะ [10] โดยเติมตัวอย่างเอนไซม์ 0.05 มล. ลงในสารละลายลินามารินบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วย HPLC (ตามวิธีการข้อ 2.3) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v) 0.05 มล. ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.2 มล. ในขวด vial ที่มีฝาปิดมิดชิดเพื่อป้องกันการรั่วของไซยาไนด์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มล. โดยการใช้เข็มฉีดยาฉีดผ่านจุกยางของขวด ตามด้วยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 1.4 มล. สารละลายที่ได้จะถูกทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดสี โดยเติมสารละลาย chloramine T (Fluka) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 0.1 มล. แล้วแช่ในน้ำเย็นนาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย pyridine/pyrazolone (pyridine: bispyrazolone: 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone = 100 มล. : 0.1 ก. : 0.5 ก.) ลงไป 0.4 มล. โดยการใช้เข็มฉีดยาเช่นเดียวกัน และปล่อยให้

เกิดปฏิกิริยานาน 90 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณของไซยาไนด์ที่เกิดขึ้น โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 620 นาโนเมตร

ปริมาณ 1 หน่วย (U) ของเอนไซม์ลินามาเรส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรทโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซยาไนด์ (HCN) 1 ไมโครโมล/นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

2.7 การตรวจสอบปริมาณโปรตีน

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนใน crude enzyme โดยวิธีของ Lowry และคณะ [11] และใช้สารละลาย bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) เป็นสารมาตรฐานในการเตรียมกราฟมาตรฐาน ขณะที่ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการผ่านคอลัมน์เพื่อทำให้ลินามาเรสบริสุทธิ์ใช้วิธีการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

2.8 การทำให้เอนไซม์ลินามาเรสบริสุทธิ์

การทำให้ลินามาเรสบริสุทธิ์ใช้วิธีการของ Cooke และคณะ [9] โดยนำ crude linamarase ที่ได้จากการสกัดเนื้อมันสำปะหลังด้วย Buffer C มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60 (w/v) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 แล้ว dialysis ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันประมาณ 10 ครั้ง เอนไซม์เข้มข้นที่ได้นำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl (Tosoh) ขนาด 2.0 x 4.8 ซม. ที่ถูก equilibrate ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ภายหลังการเติมเอนไซม์และล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันจนไม่สามารถตรวจวัดปริมาณโปรตีนในน้ำล้างได้แล้ว ชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ด้วย linear gradient ของ Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.0-0.6 โมลาร์ ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที โดยเก็บตัวอย่าง fraction ละ 1 มล. มาตรวจสอบปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ลินามาเรสในแต่ละ fraction ตามวิธีการที่ได้เสนอไว้ข้างต้น

2.9 Gel electrophoresis

การตรวจสอบความบริสุทธิ์และจำนวนของโปรตีนในตัวอย่างใช้วิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีการของ Laemmli [12] โดยต้มตัวอย่างโปรตีนใน sample buffer ซึ่งประกอบด้วย SDS 4% (w/v) β-mercaptoethanol 5% (v/v) glycerol 20% (w/v) bromophenol blue 0.2% (w/v) และ Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 6.8) เป็นเวลา 5 นาที ใช้ stacking gel และ separating gel ที่ประกอบด้วย polyacrylamide 5% และ 10% ตามลำดับ และใช้ชุดโปรตีนมาตรฐานจากบริษัท Promega เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ภายหลังจากการทำ electrophoresis เสร็จแล้ว นำเจลไปย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของลินามาเรสบริสุทธิ์

2.10.1 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์

ตรวจสอบค่าพีเอชที่ให้กิจกรรมของลินามาเรสสูงสุด โดยบ่มลินามาเรสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากขั้นตอน 2.8 กับลินามารินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากขั้นตอน 2.3 ความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอชต่างๆ ได้แก่ citrate buffer (pH 4.0-6.0), phosphate buffer (pH 6.0-8.0), Tris-HCl buffer (pH 8.0-10.0) ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณของไซยาไนด์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของเอนไซม์ตามวิธีข้างต้น

2.10.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

ตรวจวัดกิจกรรมลินามาเรสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากขั้นตอน 2.8 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอช 7.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่ลินามาเรสมีกิจกรรมสูงสุด โดยได้ผลจากการทดลองในหัวข้อ 2.10.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ (30-80 °C) เป็นเวลา 15 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณของไซยาไนด์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของเอนไซม์ตามวิธีข้างต้น

2.11 การตรวจสอบเสถียรภาพต่อการทำงานของลินามาเรสบริสุทธิ์

2.11.1 เสถียรภาพของเอนไซม์ต่อพีเอช

แช่ลินามาเรสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากขั้นตอน 2.8 ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.0-10.0 อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำเอนไซม์มาตรวจสอบกิจกรรม โดยเติมลินามารินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากขั้นตอน 2.3 ความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 แล้ววัดปริมาณไซยาไนด์ตามวิธีข้างต้น

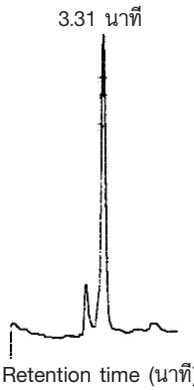
2.11.2 เสถียรภาพของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

ตรวจสอบเสถียรภาพของลินามาเรสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากขั้นตอน 2.8 โดยแช่เอนไซม์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 และแปรผันอุณหภูมิระหว่าง 30-80 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธีข้างต้น

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การสกัดและทำให้ลินามารินบริสุทธิ์

สกัด crude linamarin ออกจากเปลือกมันสำปะหลัง ด้วยกรดซัลฟูริกเย็นที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ และตรวจวัดปริมาณลินามารินด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ NH_2 Lichrospher 100 ขนาด 4 x 250 มม. และใช้ acetronitrile ร้อยละ 70 (v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และคำนวณความเข้มข้นของลินามารินจาก chromatogram ที่ได้ โดยใช้ลินามารินทางการค้าเป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าสามารถสกัดลินามารินได้มากถึง 34.86 ก./ก.ก. (น้ำหนักแห้งของเปลือกมันสำปะหลัง) ภายหลังจากการทำให้บริสุทธิ์สองขั้นตอนโดย HPLC ซึ่งแสดง chromatogram ดังรูปที่ 1 และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของลินามารินที่ได้ด้วย TLC พบว่าลินามารินที่ได้มีความบริสุทธิ์เทียบเท่ากับลินามารินมาตรฐานทางการค้า (รูปที่ 2) ซึ่งลินามารินทางการค้ามีราคาแพงมาก โดยมีราคา 3,500 ดอลลาร์ต่อกรัม [13] งานวิจัยนี้จะใช้ลินามารินบริสุทธิ์ที่ได้เป็นสับสเตรทสำหรับตรวจสอบกิจกรรมของ crude linamarase และลินามาเรสบริสุทธิ์



รูปที่ 1 HPLC chromatogram ของลินามารินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สองขั้นตอน

รูปที่ 2 TLC ของลินามารินบริสุทธิ์

Lane 1: ลินามารินบริสุทธิ์

Lane 2: ลินามารินจากบริษัท A.G. Scientific, Biochemical Manufacturer ซึ่งใช้เป็น สารมาตรฐาน

3.2 การสกัดลินามาเรสจากเนื้อมันสำปะหลัง

แม้ว่าลินามาเรสจะเป็น cyanide-releasing enzyme ที่มีอยู่ในมันสำปะหลัง และมีการสกัดและศึกษาคุณสมบัติต่างๆ มาพอสมควร แต่การศึกษาก่อนหน้านี้นิยมสกัดลินามาเรสออกจากมันสำปะหลังโดยใช้วิธีการสกัดแบบ hydrophilic extraction [6-7, 14-17] ด้วยบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจทำให้สกัดลินามาเรสออกมาได้น้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงดัดแปลงปรับปรุงเพื่อเพิ่ม hydrophobicity ให้กับระบบการสกัด โดยเติม Triton X-100 Tween 20 หรือ Tween 80 1% ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดลินามาเรส นอกจากนี้งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้เนื้อมันสำปะหลังสายพันธุ์ KU-50 ซึ่งเป็นมันสำปะหลังชนิดขมซึ่งคาดว่ามีปริมาณลินามาเรสสูง และยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาลินามาเรสจากมันสำปะหลังสายพันธุ์นี้มาก่อน อีกทั้งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมปลูกกันมากสายพันธุ์หนึ่งในประเทศไทย ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1

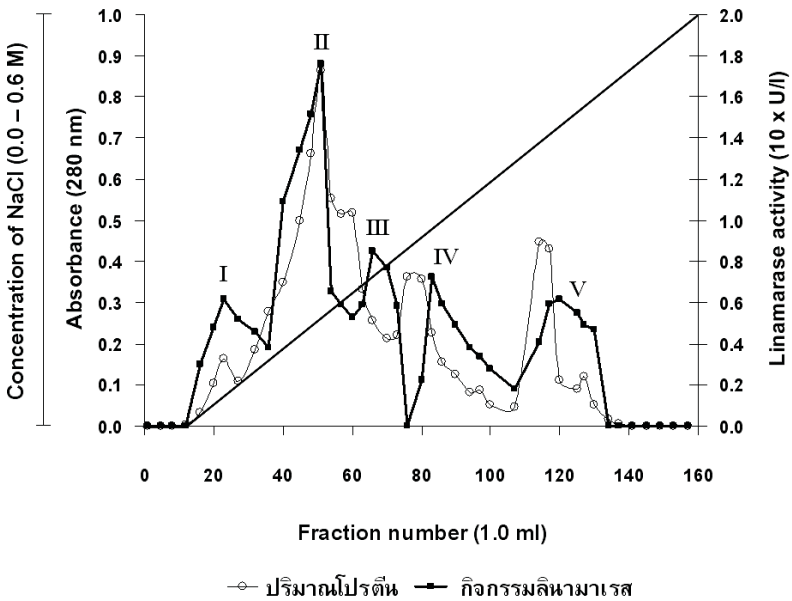
ตารางที่ 1 การสกัด crude linamarase จากเนื้อมันสำปะหลังโดยบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ

Extraction buffer	Total protein (g)	Total linamarase (U)	Specific linamarase activity (U/g)
Buffer A	1.14 ± 0.13	56.72 ± 0.96	49.75 ± 1.09
Buffer B	1.75 ± 0.07	88.28 ± 1.84	50.45 ± 1.33
Buffer C	1.22 ± 0.18	134.79 ± 1.50	110.48 ± 1.93
Buffer D	1.20 ± 0.20	106.43 ± 1.34	88.69 ± 1.52

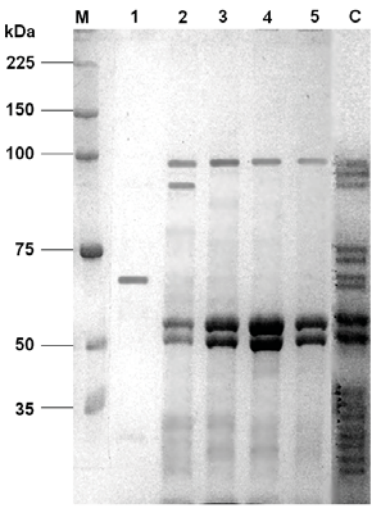
จากตารางที่ 1 พบว่าการสกัด crude enzyme ออกจากเนื้อมันสำปะหลัง โดยการใช้ Buffer B (Triton X-100 1%) Buffer C (Tween 20 1%) หรือ Buffer D (Tween 80 1%) สามารถสกัดลินามาเรสออกจากเนื้อมันสำปะหลังได้มากกว่าการสกัดโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียว (Buffer A) แม้ว่า Buffer C ไม่ใช่บัฟเฟอร์ที่สกัดโปรตีนจากมันสำปะหลังได้มากที่สุด อย่างไรก็ตาม Buffer C ให้ค่า specific activity และปริมาณลินามาเรสทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งแสดงว่าการสกัดลินามาเรสมีความจำเพาะกับชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบความเป็น hydrophobic ในบัฟเฟอร์แต่ละชนิด พบว่า Buffer D มีค่า hydrophobic มากกว่า Buffer C และ Buffer B ตามลำดับ [18] แต่ค่า specific activity ของลินามาเรสในสารสกัดจาก Buffer D ไม่ได้มีค่าสูงที่สุด ซึ่งผลการทดลองแสดงว่าชนิดและ hydrophobicity ของบัฟเฟอร์มีผลต่อการสกัดลินามาเรส ดังนั้น Buffer C จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการสกัดลินามาเรสออกจากเนื้อมันสำปะหลังเพื่อทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ต่อไป

3.3 การทำให้ลินามาเรสบริสุทธิ์

ภายหลังการชะเอนไซม์ลินามาเรสออกจากคอลัมน์ DEAE-Toyopearl ด้วย linear gradient ของ Tris-HCl buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.0-0.6 โมลาร์ ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที ปรากฏลินามาเรส 5 peak (รูปที่ 3) เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ในแต่ละ peak ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 4) พบว่าลินามาเรสที่ได้จาก peak I (Fraction ที่ 18-25) แสดงแถบของโปรตีนเพียงแถบเดียวซึ่งมีขนาดประมาณ 65 กิโลดาลตัน และมีค่า specific linamarase activity เท่ากับ 240.54 หน่วยต่อกรัมโปรตีน (ตารางที่ 2) ดังนั้นลินามาเรสบริสุทธิ์จาก peak นี้จึงถูกรวบรวมเพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ต่อไป นอกจากนี้งานวิจัยนี้สามารถแยกลินามาเรสออกได้อย่างน้อย 5 ชนิด (จาก 5 peak) ตามความแตกต่างของประจุ โดยใน peak ที่ 2 มีโปรตีนอย่างน้อย 4 แถบ ขณะที่ peak ที่ 3 4 และ 5 มีโปรตีนอย่างน้อย 3 แถบ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยอื่นที่พบว่าเนื้อเยื่อหนึ่งๆ ของมันสำปะหลังจะพบลินามาเรสเพียง 3 ชนิด ที่มีขนาดเท่ากันประมาณ 63 กิโลดาลตัน แต่แสดงค่า pI ต่างกันที่ 4.3 3.3 และ 2.9 [15-16] ซึ่งจากแถบโปรตีนในแต่ละแถวที่แสดงในรูปที่ 4 ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าลินามาเรสทั้ง 5 peak ที่พบนี้มีขนาดเท่าไหร่และมีหลาย isozyme หรือไม่ ดังนั้น ลินามาเรสในแต่ละ peak จึงน่าสนใจที่จะทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ต่อไป และจากรูปที่ 4 จะเห็นได้ว่าใน crude linamarase (lane C) มีโปรตีนหลายแถบ แต่เมื่อนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE- Toyopearl โปรตีนส่วนหนึ่งไม่สามารถจับกับคอลัมน์ DEAE-Toyopearl ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลอง จึงหลุดออกมาจากคอลัมน์ตั้งแต่ขั้นตอนการล้างคอลัมน์ด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ดังนั้นบางแถบโปรตีนจึงไม่มีปรากฏอยู่ใน lane 1-5 ของรูปที่ 4 ซึ่ง lane 1-5 นี้จะปรากฏแต่แถบของโปรตีนที่สามารถจับกับคอลัมน์และถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย linear gradient ของ Tris-HCl buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.0-0.6 โมลาร์



รูปที่ 3 รูปแบบของโปรตีนและลินามาเรสที่ชะออกจากคอลัมน์ DEAE-Toyopearl ด้วย linear gradient ของ Tris-HCl buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.0-0.6 โมลาร์



รูปที่ 4 SDS-PAGE ของลินามาเรสบริสุทธิ์จากเนื้อมันสำปะหลัง

Lane M: โปรตีนมาตรฐาน

Lane 1: ลินามาเรสบริสุทธิ์จาก peak I

Lane 2: ลินามาเรสจาก peak II

Lane 3: ลินามาเรสจาก peak III

Lane 4: ลินามาเรสจาก peak VI

Lane 5: ลินามาเรสจาก peak V

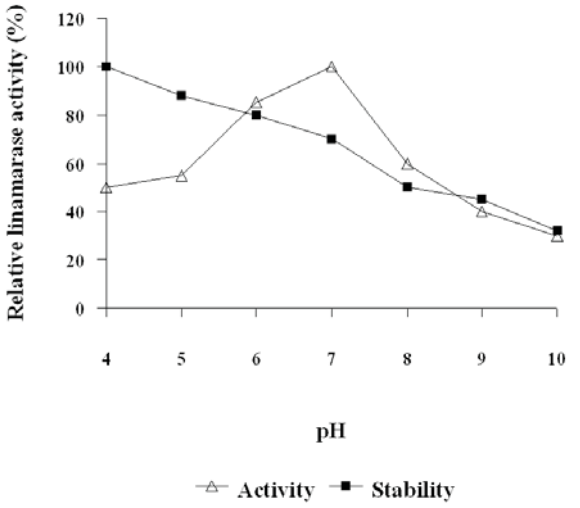
Lane C: Crude linamarase

ตารางที่ 2 การทำให้ลินามาเรสจากเนื้อมันสำปะหลังบริสุทธิ์

Purification step	Total Protein (g)	Total Activity (U)	Specific Activity (Unit/g)	Purification Factor	Yield (%)
Crude enzyme	1.22 ± 0.18	134.79 ± 1.50	110.48 ± 1.93	1.00	100.00
60% Ammonium sulfate precipitation	0.90 ± 0.07	121.81 ± 0.65	135.34 ± 1.62	1.23	90.37
DEAE-Toyopearl	0.13 ± 0.01	31.27 ± 0.18	240.54 ± 1.47	2.18	23.20

3.4 ผลของพีเอชต่อการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์

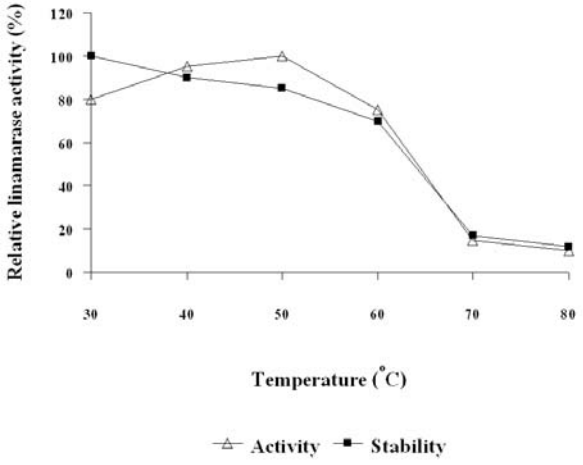
จากรูปที่ 5 พบว่าลินามาเรสบริสุทธิ์ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0 ถึง 7.0 (มากกว่าร้อยละ 80) โดยมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7.0 และจากการตรวจสอบเสถียรภาพของลินามาเรสต่อพีเอช พบว่าลินามาเรสมีเสถียรภาพมากกว่าร้อยละ 80 ที่พีเอช 4.0 ถึง 6.0 โดยเสถียรภาพของลินามาเรสสูงสุดที่พีเอช 4.0 ในขณะที่พีเอช 7.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่ลินามาเรสทำงานได้ดีที่สุด มีเสถียรภาพของเอนไซม์เพียงร้อยละ 70 และที่พีเอชมากกว่า 8.0 เสถียรภาพของลินามาเรสลดลงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 50 อย่างไรก็ตามที่พีเอช 8.0-10.0 ลินามาเรสบริสุทธิ์ที่ได้จากเนื้อมันสำปะหลังยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งต่างจาก cassava latex linamarase ซึ่งไม่สามารถย่อยสับสเตรทได้เลยที่พีเอชมากกว่า 8.0 และมีเสถียรภาพต่ำที่พีเอชสูง [19] และเนื่องจากลินามาเรสบริสุทธิ์ที่ได้นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 และมีเสถียรภาพต่อพีเอชในช่วงกว้างจึงทำให้ลินามาเรสบริสุทธิ์มีคุณสมบัติแตกต่างจากลินามาเรสที่ได้จาก *Trifolium repens* (โคลเวอร์ขาว) [20], *Linum usitatissimum* (ลินิน) [21], *Hevea brasiliensis* (ยางพารา) [22] และ *Phaseolus lunatus* (ถั่วราชมาด) [23] ซึ่งลินามาเรสเหล่านี้ทำงานได้ดีที่พีเอชต่ำกว่า (optimum pH ประมาณ 5) และมีเสถียรภาพต่อพีเอชในช่วงแคบๆ (พีเอชประมาณ 4-5) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า แม้จะเป็นเอนไซม์ลินามาเรสที่มาจากพืชและสามารถย่อยสลายลินามารินได้เหมือนกัน แต่หากมาจากพืชต่างชนิดกันจะมีความสามารถในการทำงานในช่วงพีเอชที่ต่างกัน



รูปที่ 5 ผลของพีเอชต่อการทำงานและเสถียรภาพของลินามาเรสบริสุทธิ์

3.5 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์

ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของลินามาเรสแสดงดังรูปที่ 6 ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของลินามาเรสบริสุทธิ์อยู่ในช่วงกว้างระหว่าง 30-60 °C โดยทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 °C อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของลินามาเรสลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 °C ขณะที่ลินามาเรสมีเสถียรภาพดีมากกว่าร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 30-50 °C ที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 °C ลินามาเรสมีกิจกรรมและเสถียรภาพน้อยกว่าร้อยละ 20 ผลการทดลองนี้แตกต่างจากผลการทดลองของ Yeoh [6] ที่พบว่าลินามาเรสที่สกัดได้จากใบและเปลือกของมันสำปะหลังนั้นทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 °C แต่ที่อุณหภูมินี้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมถึงร้อยละ 34 และร้อยละ 45 ตามลำดับ ขณะที่ลินามาเรสบริสุทธิ์จากงานวิจัยนี้ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 °C และที่อุณหภูมินี้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียงร้อยละ 15 นอกจากนี้ถ้าเปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 55 °C เท่ากัน จะเห็นได้ว่าลินามาเรสบริสุทธิ์จากงานวิจัยนี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียงร้อยละ 20 เท่านั้น และจากผลการทดลองของ Elias และคณะ [19] ที่พบว่าลินามาเรสที่สกัดได้จากน้ำยางของมันสำปะหลังทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 °C ขณะที่อุณหภูมิ 60 °C กิจกรรมของเอนไซม์เหลือเพียงร้อยละ 20 และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 °C และจากการทดลองของ Eksittikul และ Chulavatnatol [15] ที่พบว่าลินามาเรสที่สกัดได้จากก้านใบ ลำต้น และเปลือกมันสำปะหลังสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โดยสมบูรณ์ที่อุณหภูมิเพียง 60 °C ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าลินามาเรสบริสุทธิ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้มีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลินามาเรสที่สกัดได้จากก้านใบ ลำต้น และเปลือกมันสำปะหลัง [15] ลินามาเรสที่สกัดได้จากใบและเปลือกของมันสำปะหลัง [6] และลินามาเรสที่สกัดได้จากน้ำยางของมันสำปะหลัง [19] ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองนั้นเป็นคนละสายพันธุ์ โดย Yeoh [6] ใช้สายพันธุ์ Merah Jambu Elias และคณะ [19] ใช้สายพันธุ์ M4 ขณะที่การทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ KU-50 หรืออาจเนื่องมาจากลินามาเรสสกัดจากเนื้อเยื่อคนละส่วนของมันสำปะหลัง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เอนไซม์มีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิแตกต่างกัน



รูปที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและเสถียรภาพของลินามาเรสบริสุทธิ์

3.6 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของลินามาเรสบริสุทธิ์

การทดลองนี้สนใจศึกษาผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของลินามาเรสบริสุทธิ์ที่สกัดจากส่วนของเนื้อมันสำปะหลังเพื่อจะได้ทราบว่ามีผลเหมือนหรือต่างจากลินามาเรสบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากส่วนอื่นๆ ของมันสำปะหลังอย่างไร จากตารางที่ 3 พบว่าการเติม EDTA ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 มิลลิโมลาร์ มีผลให้ลินามาเรสบริสุทธิ์มีกิจกรรมลดลงเพียงร้อยละ 4.62 และถึงแม้จะเติม EDTA ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิโมลาร์แล้วก็ตาม แต่กิจกรรมลินามาเรสลดลงเพียงร้อยละ 10.77 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติม EDTA ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า EDTA ไม่มีผลต่อการทำงานของลินามาเรส ซึ่งผลการทดลองที่ได้คล้ายกับงานวิจัยของ Cooke และคณะ [14] ที่ศึกษาลินามาเรสบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเนื้อมันสำปะหลังเช่นกัน และ Eksittikul และ Chulavatnatol [15] ที่ศึกษาลินามาเรสบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากก้านใบ ลำต้น และเปลือกของมันสำปะหลัง ซึ่งพบว่าเมื่อเติม EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลต่อกิจกรรมของลินามาเรส และเพื่อให้เกิดความแน่ใจว่าโลหะต่างๆ ถูกกำจัดออกจากตัวอย่างลินามาเรสบริสุทธิ์จนหมดแล้ว จึงได้นำตัวอย่างลินามาเรสบริสุทธิ์ที่ผ่านการเติม EDTA 100 มิลลิโมลาร์ ไป dialysis ด้วย Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 7.0) ก่อน แล้วจึงนำมาบ่มกับโลหะซัลเฟตชนิดต่างๆ (โลหะซัลเฟตจะมีความสามารถในการละลายได้ดีกว่าโลหะในรูปอื่น) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ (ที่ความเข้มข้นนี้การเติมอิออนโลหะต่างๆ ไม่มีผลต่อ background ของการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์) ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ พบว่า Na^{+} Mn^{2+} Ca^{2+} Zn^{2+} และ Mg^{2+} มีผลช่วยส่งเสริมให้กิจกรรมของลินามาเรสเพิ่มขึ้น ขณะที่ Fe^{2+} Cu^{2+} และ NH_4^{+} ทำให้กิจกรรมของลินามาเรสลดลงน้อยกว่าร้อยละ 25 ส่วน Fe^{3+} และ Cd^{2+} ทำให้กิจกรรมของลินามาเรสลดลงมากกว่าร้อยละ 50 และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Elias และคณะ [19] ที่พบว่า Fe^{3+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของลินามาเรสจากน้ำยางของมันสำปะหลังได้เช่นกัน แต่มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมากถึงร้อยละ 80 ดังนั้นผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าลินามาเรสบริสุทธิ์ในงานวิจัยนี้มีเสถียรภาพต่ออิออน Fe^{+3} มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลินามาเรสจากน้ำยางของมันสำปะหลัง นอกจากนี้จากการศึกษาของ Eksittikul และ Chulavatnatol [15] พบว่ากิจกรรมของลินามาเรสที่สกัดได้จากก้านใบของมันสำปะหลังถูกยับยั้งเล็กน้อยด้วย Mn^{2+} ขณะที่ Mg^{2+} Ca^{2+} และ Cu^{2+} ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ แต่จากผลงานวิจัยนี้พบว่าอิออนทั้ง 3 ชนิด ยกเว้น Cu^{2+} สามารถส่งเสริมกิจกรรมของลินามาเรสบริสุทธิ์ จากผลดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่าลินามาเรสจากมันสำปะหลังต่างสายพันธุ์ และต่างเนื้อเยื่อกัน อาจมีกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้อง ณ บริเวณ active site แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้าง 3 มิติของลินามาเรสที่ได้จากเนื้อมันสำปะหลังสายพันธุ์ KU-50 ในโอกาสต่อไป

ตารางที่ 3 ผลของอิออนโลหะและ EDTA ต่อการทำงานของลินามาเรสบริสุทธิ์

Ion or EDTA (mM)	Relative activity (%)
None[a]	100.00 ± 2.97
EDTA (10)	95.38 ± 2.83
EDTA (100)	89.23 ± 2.65
Na_2SO_4	137.44 ± 4.08
$MnSO_4.H_2O$	137.44 ± 3.95
$CaSO_4.2H_2O$	123.08 ± 3.65
$ZnSO_4.7H_2O$	121.03 ± 3.59
$MgSO_4.7H_2O$	115.90 ± 3.44
$FeSO_4.7H_2O$	94.87 ± 2.81
$CuSO_4.5H_2O$	75.38 ± 2.24
$(NH_4)_2SO_4$	74.36 ± 2.20
$Fe_2(SO_4)_3$	46.15 ± 1.37
$3CdSO_4.8H_2O$	42.56 ± 1.26

[a]ลินามาเรสบริสุทธิ์ที่ไม่ได้เติม EDTA

4. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาการสกัดลินามารินซึ่งเป็นสับสเตรทออกจากส่วนของเปลือกมันสำปะหลัง และสกัดลินามาเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ออกจากส่วนของเนื้อมันสำปะหลังสายพันธุ์ KU-50 ผลการทดลองพบว่าสามารถสกัดและทำให้ลินามารินบริสุทธิ์โดยใช้กรดซัลฟูริกเย็นและแยกด้วย HPLC 2 ครั้ง โดยคอลัมน์ NH_2 Lichrospher 100 นอกจากนี้พบว่าเมื่อเพิ่ม hydrophobicity ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเนื้อมันสำปะหลัง สามารถสกัดลินามาเรสออกจากเนื้อมันสำปะหลังได้มากขึ้น และพบว่า Buffer C (PVP 1% และ Tween 20 1% ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดลินามาเรสออกจากเนื้อมันสำปะหลัง และเมื่อนำลินามาเรสที่สกัดด้วย Buffer C มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl พบลินามาเรสบริสุทธิ์ขนาด 65 กิโลดาลตัน จากนั้นเมื่อนำลินามาเรสบริสุทธิ์ไปทดสอบเสถียรภาพพบว่ามีเสถียรภาพในช่วงกว้างต่อพีเอชและอุณหภูมิ ขณะที่สภาวะที่เหมาะสม ต่อการทำงานของเอนไซม์คือพีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 50 °C และพบว่า EDTA ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่ Na^+, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+} และ Mg^{2+} มีผลส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรสบริสุทธิ์ให้เพิ่มขึ้น ดังนั้นลินามาเรสบริสุทธิ์ที่ได้น่าจะถูกนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 6 ประจำปี 2546 และเงินงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ประจำปี 2549-2551

6. เอกสารอ้างอิง

1. Du, L., Bokanga, M., Moller, B.L., and Halkier, B.A., 1995, “The Biosynthesis of Cyanogenic Glucosides in Roots of Cassava”, *Phytochemistry*, Vol. 39, pp. 323-326.

2. McMahon, J.M., White, W.L.B., and Sayre,

R.T., 1995, "Cyanogenesis in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)", *Journal of Experimental Botany*, Vol. 46, pp. 731-741.

3. Santana, M.A., Vasquez, V., Matehus, J., and Aldao, R.R., 2002, "Liήamarase Expression in Cassava Cultivars with Roots of Low- and High-Cyanide Content", *Plant Physiology*, Vol. 129, pp. 1686-1694.

4. Bradbury, M.G., Egan, S.V., and Bradbury, J.H., 1999, "Picrate Paper Kits for Determination of Total Cyanogens in Cassava Roots and All Forms of Cyanogens in Cassava Products", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 79, pp. 593-601.

5. Yeoh, H.H., 1998, "Monitoring the Cyanogenic Potential of Cassava: the Trend Towards Biosensor Development", *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 17, pp. 234-240.

6. Yeoh, H.H., 1989, "Kinetic Properties of β-Glucosidase from Cassava", *Phytochemistry*, Vol. 28, pp. 721-724.

7. Nambisan, B. and Sundaresan, S., 1994, "Distribution of Linamarin and Its Metabolizing Enzymes in Cassava Tissues", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 66, pp. 503-507.

8. Sornyotha, S., Kyu, K.L., and Ratanakhanokchai, K., 2007, "Purification and Detection of Linamarin from Cassava Root Cortex by High Performance Liquid Chromatography", *Food Chemistry*, Vol. 104, pp. 1750-1754.

9. Cooke, R.D., 1978, "An Enzymatic Assay for the Total Cyanide Content of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 29, pp. 345-352.

10. O'Brien, G.M., Taylor, A.J., and Poulter, N.H., 1991, "Improved Enzymatic Assay for Cyanogens in Fresh and Processed Cassava", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 56, pp. 277-289.

11. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 193, pp. 265-275.

12. Laemmli, U.K., 1970, "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685.

13. A.G. Scientific, Inc., 2008, Product Catalog: Linamarin 100 mg (L1045) [Online], Available: http:// www.agscientific.com/ Virtual/ VirtualPages/ Item__Page__ALL__TYPES.asp? ItemCode = L1045&Item__Process__Mode = ADD [15 May 2008].

14. Cooke, R.D., Blake, G.G., and Battershill, J.M., 1978, "Purification of Cassava Linamarase", *Phytochemistry*, Vol. 17, pp. 381-383.

15. Eksittikul, T. and Chulavatnatol, M., 1988, "Characterization of Cyanogenic β-Glucosidase (Linamarase) from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)", *Archives of Biochemistry and Biophysics,* Vol. 266, pp. 263-269.

16. Mkpong, O.E., Yan, H., Chism, G., and Sayre, R.T., 1990, "Purification, Characterization and Localization of Linamarase in Cassava", *Plant Physiology*, Vol. 93, pp. 176-181.

17. Yeoh, H.H., Bradbury, J.H., and Egan, S.V., 1997, "A Simple and Rapid Method for Isolating Cassava Leaf Linamarase Suitable for Cassava Cyanide Determination", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 75, pp. 258-262.

18. Perry, H.R. and Green, D., 1984, "Perry's Chemical Engineer's Handbook", Sixth edition, Malaysia, McGraw-Hill, pp. 15.6-15.13.

19. Elias, M., Nambisan, B., and Sudhakaran, P.R., 1997, "Characterization of Linamarase of Latex and Its Localization in Petioles in Cassava", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 341,

pp. 222-228.

20. Boersma, P., Kakes, P., and Schram, A.W., 1983, "Linamarase and β-Glucosidase Activity in Natural Populations of *Trifolium repens*", *Acta Botanica Neerlandica*, Vol. 32, pp. 39-47.

21. Fan, T.W.M. and Conn, E.E., 1985, "Isolation of Characterization of Two Cyanogenic β-Glucosidases from Flaxseeds", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 243, pp. 361-373.

22. Seimar, D., Lieberei, R., Biehl, B., and Voigt, J., 1987, "Hevea Linamarase-A Nonspecific β-Glycosidase", *Plant Physiology*, Vol. 83, pp. 557-563.

23. Itoh-Nashida, T., Hiraiwa, M., and Uda, Y., 1987, "Purification and Properties of β-D-Glucosidase (Linamarase) from the Butter Bean, *Phaseolus lunatus*," *Journal of Biochemistry*, Vol. 101, pp. 847-854.