บทที่ 1

บทนำ

มันสำปะหลัง (Cassava, Manihot esculenta Crantz) จัดเป็นพืชที่เป็นอาหารที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง ปลูกได้ทั่วไปในบริเวณเขตร้อน เป็นพืชที่มีปริมาณแป้งสูง แต่มีโปรตีนต่ำและในส่วนของราก, ลำต้น และใบ จะมีสารประกอบไซยาโนเจนิคกลูโคซายด์ (cyanogenic glucosides) จากการตรวจสอบ พบว่ามีส่วนประกอบของลินามาริน (Linamarin) มากกว่า 90% ที่เหลือเป็นโลทอสตราลิน (Lotaustralin)(Cooke และ Coursey, 1981) มันสำปะหลังมี 2 ชนิดคือ ชนิดขม (Bitter type) และชนิดหวาน (Sweet type) (Rogers และ Appen, 1973) มันขมจะมีปริมาณแป้งสูง เนื้อหยาบ และมีไซยาไนด์ ในปริมาณที่สูงกว่ามันหวาน (เอกสารเศรษฐกิจการเกษตร เลขที่ 82) ประเทศบราซิล, อินโดนีเซีย,ไนจีเรีย และอีกหลาย ๆ ประเทศมีการใช้มันสำปะหลังเป็นอาหารหลัก (Ikediobi และ Onyike,1982 a,b; Ketiker และคณะ, 1978) และใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมทั้งใช้เป็นอาหารสัตว์ด้วย

กรมส่งเสริมการเกษตร (2519)ได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง และสรุปออกมาได้ดังนี้

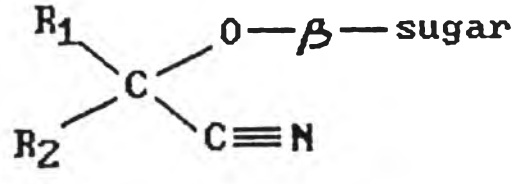
ส่วนประกอบของหัวมันสำปะหลัง	เปอร์เซนต์
ความชื้น	63.80
เถ้า	1.44
โปรตีน	0.96
ไขมัน	0.26
กรดไฮโดรไซยานิค (HCN)	0.02
กาก	0.85
แป้ง	27.65
อื่น ๆ	5.04
แคลอรี่ต่อ 1 กก.	1,403.00

แต่อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของสารอาหารในหัวมันสำปะหลัง จะเปลี่ยนแปลงตามสายพันธุ์ อายุ และสิ่งแวดล้อม เช่น ปริมาณแร่ธาตุในดินที่ปลูก (Cassava/ Nutrition project,1979)

สำหรับในประเทศไทย มันสำปะหลังจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญ ต่อเศรษฐกิจของประเทศ ผลผลิตส่วนใหญ่ของมันสำปะหลัง จะถูกส่งเข้าโรงงาน เพื่อแปรสภาพเป็นผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังหลายชนิด เช่น มันเส้น, มันอัดเม็ด, แป้งมันสำปะหลัง เพื่อการส่งออก โดยมีตลาดต่างประเทศที่สำคัญ คือ กลุ่มประเทศประชาคมเศรษฐกิจยุโรป และบางส่วนจะถูกนำไปใช้เพื่อเป็นอาหาร, อาหารสัตว์ หรือใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมผงชูรส และ แอล-ไลซีน (นิมิธ ศุภนิมิตน์, 2517) เป็นต้น ต่อมาปริมาณการส่งออกของผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังจากประเทศไทย อยู่ในปริมาณที่จำกัด จึงทำให้ปริมาณมันสำปะหลังภายในประเทศเพิ่มมากขึ้นและมีราคาถูก ซึ่งทางรัฐบาลก็ได้พยายามแก้ไข โดยการหาตลาดใหม่ ลดพื้นที่การปลูกมันสำปะหลัง รวมทั้งส่งเสริมการนำมันสำปะหลังไปใช้ประโยชน์ในประเทศให้มากขึ้น (รายงานสัมมนาการใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลัง, 2526) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการนำมันสำปะหลังมาใช้เป็นอาหารสัตว์ แต่ปัญหาสำคัญที่พบนอกเหนือจากการที่มีโปรตีนต่ำแล้วก็คือความเป็นพิษในมันสำปะหลัง ซึ่งเกิดจากสารประกอบไซยาโนเจนิคกลูโคซายด์ลินามาริน หรือโลทอสตราลินซึ่งจะพบมากบริเวณเปลือกของมันสำปะหลัง ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ลินามาเรสที่มีอยู่ในมันสำปะหลังเอง เมื่อเนื้อเยื่อหรือเซลของมันถูกทำลายทำให้ปลดปล่อยสารพิษในรูปกรดไฮโดรไซยานิค ซึ่งเป็นตัวกำหนดความเป็นพิษในมันสำปะหลัง (Conn,1969)

สารประกอบไซยาโนเจนิคไกลโคซายด์

เป็นสารประกอบระหว่างน้ำตาล เกาะอยู่กับส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลหรืออะไกลโคน (aglycone) ที่มีไซยาไนด์เป็นองค์ประกอบ และจะแตกตัวให้กรดไฮโดรไซยานิค, น้ำตาล และ อัลดีไฮด์ หรือคีโตนเมื่อถูกกรดอ่อน หรือเอนไซม์ที่เหมาะสม (Conn, 1969) สารประกอบนี้พบได้มากในพืชชั้นสูงหลายชนิด และแมลงบางชนิด รวมทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และเฟิรน์ (Vannesland et.al, 1981) สูตรโครงสร้างทั่วไปของไซยาโนเจนิคไกลโคซายด์ดังแสดงในรูป



ส่วนที่เป็นน้ำตาลส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคส ซึ่งอาจเรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่า ไซยาโนเจนิคกลูโคซายด์ และต่อเชื่อมกับส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล (non-sugar part) โดยพันธะเบต้า (β-linkage)

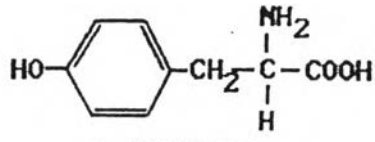
R_1 แสดงถึงอลิฟาติก หรืออะโรมาติกกรุ๊ป (Aliphatic or Aromatic group)

R_2 แสดงถึงไฮโดรเจนอะตอมเป็นส่วนใหญ่

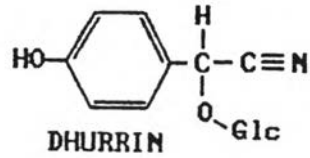
Conn (1969) ได้จัดแบ่งกลุ่มของสารประกอบ ไซยาโนเจนิคไกลโคซายด์ที่พบในพืชประมาณ 1000 ชนิด (species) จาก 250 สกุล (genus)ออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆโดยอาศัยสูตรโครงสร้างได้เป็น 12 กลุ่ม ดังแสดงในภาคผนวก ฉ

สารประกอบไซยาโนเจนิคกลูโคซายด์บางชนิดสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้จากกรดอะมิโนที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกัน (Conn and Butler, 1969) เช่น เดอริน (Dhurrin) สามารถสังเคราะห์ได้จาก แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) (Conn and Akazawa;1958,Gander;1958) พรูนาซิน (Prunasin) สามารถสังเคราะห์ได้จาก แอล - ฟินิลอะลานีน (L-phenylalanine) นอกจากนี้ ลินามาริน และโลทอสตราลิน ก็สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้จาก แอล-วาลีน (L-valine) และแอล-ไอโซลูซีน

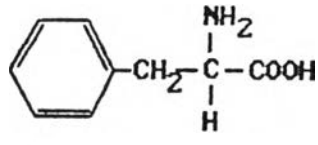
(L-isoleucine)ตามลำดับ (Butler and Butler,1960) เช่นเดียวกัน สูตรโครงสร้างของกรดอะมิโนบางชนิดเทียบกับสารประกอบไซยาโนเจนิคกลูโคซายด์ ดังแสดงในรูปข้างล่าง



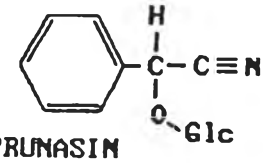
L-TYROSINE



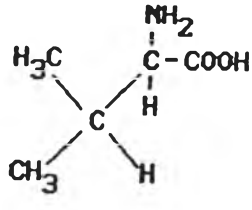
DHURRIN



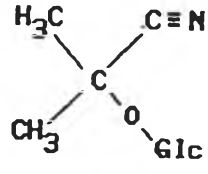
L- PHENYLALANINE



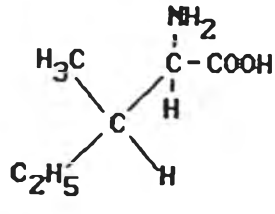
PRUNASIN



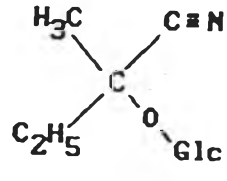
L-VALINE



LINAMARIN

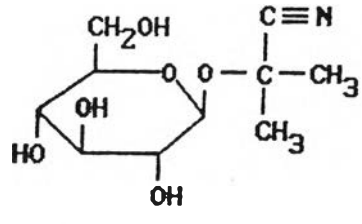


L-ISOLEUCINE

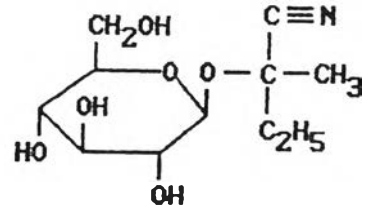


LOTAUSTRALIN

ลินามาริน และโลทอสตราลิน จัดเป็นสารประกอบไซยาโนเจนิคกลูโคซายด์ พบได้ในพืชชั้นสูงหลายชนิด(Conn,1969) เป็นสารประกอบระหว่างน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เกาะติดกับอะซิโดนไซยาโนไฮดริน และเมธิล - เอธิล - คีโดนไซยาโนไฮดริน ตามลำดับ โดยมากมักจะพบสารประกอบไซยาไนด์ทั้งสองชนิดนี้ในพืชชนิดเดียวกันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เช่น ใน Linen flax จะพบลินามาริน:โลทอสตราลินในอัตราส่วน 50:50 ,Lotus aerrvarius Brot. จะพบในอัตราส่วน 99:1 และใน Lotus tennis L.พบในอัตราส่วน 4:96 ขณะที่ในมันสำปะหลัง(Manihot esculenta Crantz) จะพบในอัตราส่วน 90:10 โดยประมาณ (Conn,1969) สูตรโครงสร้างของลินามารินและโลทอสตราลินดังแสดงในรูป



LINAMARIN

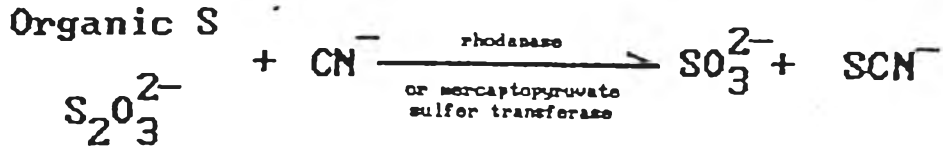


LOTAUSTRALIN

ตามปกติสารประกอบไซยาโนเจนิคกลูโคซายด์ในพืช จะอยู่ในสภาพที่ไม่เป็นพิษต่อคนหรือสัตว์ที่กินเข้าไป แต่ถ้าถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่มีความจำเพาะต่อไซยาโนเจนิคกลูโคซายด์นั้นๆ จะทำให้แตกตัวออกมาเป็นกรดไฮโดรไซยานิคอิสระ(free hydrocyanic acid หรือ HCN)ในเนื้อเยื่อซึ่งจะทำให้เกิดความเป็นพิษขึ้น (Conn, 1969)

นอกจากนี้ Conn ได้สรุปไว้ในรายงานการทดลองว่าในกรณีที่บริโภคไซยาไนด์ในปริมาณน้อยๆ เป็นเวลานานจะเกิดพิษเรื้อรังในร่างกายของคนและสัตว์ ซึ่งจะมีระบบกำจัดสารพิษเหล่านี้ได้โดยอาศัยหลายปฏิกิริยาคือ

ก. ใช้เอนไซม์โรดาเนส (rhodanase) หรือเมอร์แคบโตไนรูเวต ซัลเฟอร์ทรานสเฟอเรส (mercaptopyruvate sulfurtransferase) เร่งปฏิกิริยาการรวมตัวระหว่างสารประกอบที่มีกำมะถันกับไซยาไนด์ ได้เป็นไทโอไซยาเนต (Thiocyanate) ดังรูป



ไทโอไซยาเนตที่เกิดขึ้นจะถูกขับออกทางปัสสาวะอย่างรวดเร็ว สารนี้ไม่มีพิษเท่าไซยาไนด์แต่จะรบกวนการใช้ไอโอดีนในการผลิตไทรอกซิน (thyroxin) ทำให้การทำงานของต่อมไทรอยด์ผิดปกติ เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด นี้มีอยู่ทั่วไปในร่างกายคนและสัตว์โดยเฉพาะมีมากในเซลของตับ (Oke, 1973)

ข. สารไฮโดรโซโคบาลามิน (hydroxocobalamin) ซึ่งมีมากในตับสามารถทำปฏิกิริยากับไซยาไนด์ ได้ไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamin) หรือวิตะมินบี 12 (Lehniger, 1982)

ค. ซิสตีน (Cystine) จะทำปฏิกิริยากับไซยาไนด์ ได้ซิสเตอีน (Cysteine) และ เบต้า-ไทโอไซยาโนอะตานิน (β-Thiocyanoatanine) ซึ่งจะ tautomerize ได้กรดคาร์บอกซิลิก 2 ชนิดแล้วถูกขับออกจากร่างกายได้อย่างรวดเร็ว (Oke, 1973)

แต่ถ้ามีการบริโภคไซยาไนด์ในปริมาณมากจะทำให้เกิดความเป็นพิษในร่างกาย โดยมีรายงานว่า HCN ในปริมาณเพียง 200 มก. จะทำให้ผู้ใหญ่ที่บริโภคเข้าไปถึงตายได้ และพบว่าถ้ามี HCN กระจายอยู่ในบรรยากาศถึง 200 ส่วนในล้านส่วนจะทำให้ตายได้ภายใน 2-3 นาที เนื่องจาก HCN เป็นสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงใน metalloenzymes หลายชนิดโดยเฉพาะเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเลกตรอนในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน โดยจะไปทำปฏิกิริยากับ Fe^{3+} (Lehninger, 1982) ดังนั้นถ้าได้รับไซยาไนด์เข้าไปเกินขีดจำกัด จะทำให้เกิดการขาดออกซิเจนในระดับเซลและถึงตายได้

Bolhuis (1954) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษในมันสำปะหลัง และได้สรุปไว้เป็นมาตรฐาน คือ ถ้ามีปริมาณไซยาไนด์น้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 มก./กก. ถือว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค ถ้ามีปริมาณไซยาไนด์อยู่ระหว่าง 50-100 มก./กก. ถือว่ามีอันตรายปานกลาง แต่ถ้ามีปริมาณมากกว่า 100 มก./กก. จัดว่าเป็นอันตรายอาจถึงตายได้

การกำจัดพิษไซยาไนด์ออกจากมันสำปะหลัง

ได้มีความพยายามในการกำจัดหรือลดพิษไซยาไนด์ของมันสำปะหลัง ก่อนที่จะนำไปบริโภคหรือเลี้ยงสัตว์มานานแล้ว วิธีการหนึ่งที่ใช้ในการลดพิษไซยาไนด์ได้ดีก็คือ การปอกเปลือก เนื่องจากพบไซยาไนเจนิคกลูโคซายด์ได้มาก บริเวณเปลือกของมันสำปะหลัง (Cooke และ Coursey 1981) ดังนั้นการปอกเปลือกออกไปก่อนที่จะนำไปใช้บริโภคจึงเท่ากับเป็นการกำจัดพิษส่วนใหญ่ออกไปได้ นอกจากนี้ก็ยังมีรายงานถึงวิธีการต่างๆ ในการกำจัดพิษไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง ได้แก่

การอบแห้ง หรือการตากแดด

Cooke และ Maduagwu, (1978) ได้ทำการทดลองโดยตากชิ้นมันที่ปอกเปลือกแล้วในตู้อบแห้ง และพบว่า 1 ใน 3 ของไซยาไนด์เกาะติด จะถูกกำจัดไปที่ 47 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะที่ 47 องศาเซลเซียส จะพบว่าในช่วงแรกจะมีการลดลงของไซยาไนด์มากกว่าที่ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นสภาวะที่เอนไซม์ลินามาเรสในมันสำปะหลัง สามารถทำงานได้ และถ้าให้ความร้อนไปจนถึง 80 - 100 องศาเซลเซียส จะทำให้ไซยาไนด์เกาะติดลดลงเหลือเพียง 10 - 15% ส่วนไซยาไนด์อิสระจะสูญเสียไปถึง 80% และ 85% ที่ 47 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และจะยิ่งมากกว่า 95% เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งอัตราการสูญเสียไซยาไนด์อิสระนี้อาจเกิดจาก 3 ปัจจัยคือ 1) การระเหยของไฮโดรไซยานิคในรูปของแก๊ส 2) การย่อยสลายของไซยาโนไฮดริน ซึ่งมีความเสถียรต่ำ และ3) เนื่องจากผลของเอนไซม์ลินามาเรส ในมันสำปะหลังต่อไซยาโนไฮดริน ในช่วงแรกของการอบแห้ง (Cooke และ Coursey, 1981)

Fernandaz และ cooke (1978) ทดลองพบว่าการทำให้แห้งอย่างช้าๆ โดยอาศัยแสงแดดจะทำให้สูญเสียไซยาไนด์เกาะติดได้มาก

รติยา จันทรเทียร (2529) พบว่าการผึ่งแดดบนลานคอนกรีต และการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ทำให้ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลังลดลง โดยเมื่อผึ่งแดดบนลานคอนกรีต ไซยาไนด์อิสระในหัวมันจะลดลง 68-78% และเมื่ออบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะทำให้ไซยาไนด์อิสระลดลงเพียง 46%

การแช่น้ำและการต้ม

Cooke และ Coursey (1981) พบว่าเมื่อนำชิ้นมันสำปะหลังแช่ลงในน้ำอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และกวนอย่างเร็วตลอดเวลา จะทำให้ไซยาไนด์เกาะติดลดลงน้อยมาก ภายในเวลา 4 ชั่วโมง แต่ไซยาไนด์อิสระ จะถูกกำจัดไปได้ถึง 90% โดยละลายอยู่ในน้ำ

สำหรับในน้ำเดือด ไซยาไนด์อิสระจะถูกกำจัดออกจากชิ้นมันสดอย่างรวดเร็ว และมากกว่า 90% ภายใน 15 นาที แต่ไซยาไนด์เกาะติดจะลดลงในอัตราที่ต่ำกว่า คือ เมื่อนำชิ้นมันไปประกอบอาหาร จะทำให้ไซยาไนด์เกาะติด ลดลงไป 55% ภายในเวลา 25 นาที (Cooke และ Maduagwu, 1978)

รติยา จันทรเทียร (2529) ได้ทดลองนึ่งมันสำปะหลังด้วยไอน้ำที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที พบว่าไซยาไนด์อิสระถูกกำจัดอย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 15 นาที ไซยาไนด์อิสระจะลดลงถึง 83% แต่การนึ่ง ไม่สามารถลดปริมาณไซยาไนด์เกาะติดได้นอกจากนี้ยังพบว่าการนำมันหั่นเป็นชิ้นและผึ่งแดดจนเหลือความชื้นเพียง 10% มาแช่น้ำที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จะทำให้ปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด และไซยาไนด์เกาะติดลดลงประมาณ 50%

<u>การหมัก</u>

เป็นกระบวนการที่จะช่วยลดปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง ซึ่งจะเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ และเอนไซม์ลินามาเรสในมันสำปะหลังร่วมกัน ได้มีผู้ทำการศึกษาไว้ดังนี้

Okafor (1977) พบว่าในอาหารหมักมันสำปะหลังที่เรียกว่า การิ (Garri) ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของชาวอัฟริกัน จะมีแบคทีเรีย <u>Leuconostoc</u> sp. เกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก แต่เขาได้อธิบายว่า การแตกตัวของลินามารินส่วนใหญ่ เกิดจากเอนไซม์ลินามาเรส ในหัวมันสำปะหลังเอง มากกว่าที่จะเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรีย

Ketiker และคณะ (1978) พบว่า เมื่อนำมันสำปะหลังมาหมัก จะลดความเป็นพิษลงได้ เนื่องจากการระเหยของกรดไฮโดรไซยานิค ในสภาวะที่เป็นกรด และทำให้กลิ่นรสดีขึ้น

รติยา จันทรเทียร (2529) พบว่า การหมักแบบกึ่งไร้อากาศ โดยใช้เชื้อธรรมชาติเป็นเวลา 12 วัน จะทำให้ไซยาไนด์เกาะติด ถูกทำลายหมดในวันที่ 8 ของการหมัก แต่ไซยาไนด์อิสระยังคงอยู่ในชิ้นมันเป็นส่วนใหญ่ตลอดการทดลอง คือ 45 วัน

Tiney และคณะ (1984) พบว่าเมื่อนำมันสำปะหลัง ที่ปอกเปลือก และสับให้ชิ้นเล็กมาหมัก ค่าของไซยาไนด์อิสระในวันแรกของการหมัก จะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับการหมักมันทั้งหัว โดยเฉพาะถ้ามีการเติมน้ำเข้าไประหว่างหมัก จะทำให้ไซยาไนด์เกาะติดลดลงด้วยเช่นกัน คิดว่าน่าจะเกิดจากการย่อยสลายโดย เอนไซม์ลินามาเรสในหัวมันสำปะหลังเอง

การใช้เอนไซม์ลินามาเรส

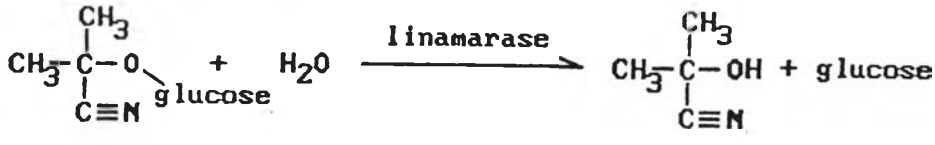
ตามปกติจะพบเอนไซม์ลินามาเรสได้ในพืชหลายชนิดที่มีสารประกอบไซยาโนเจนิค กลูโคซายด์ ลินามาริน หรือ โลทอสตราลิน อยู่ด้วย แต่โดยธรรมชาติแล้ว เอนไซม์และกลูโคซายด์ จะอยู่ในตำแหน่งที่จะไม่ทำปฏิกิริยาต่อกัน (Biochemical Product Information ของ BDH) จนกว่าเนื้อเยื่อหรือเซลของพืชนั้นถูกทำลาย เอนไซม์ลินามาเรส ซึ่งมีอยู่ในพืชนั้นจึงจะทำการย่อยสลายไซยาไนด์เกาะติด ให้ได้เป็นไซยาไนด์อิสระปลดปล่อยออกมา และระเหยไปในอากาศ เป็นการกำจัดพิษไซยาไนด์ ก่อนนำไปบริโภค ถึงแม้ว่าเอนไซม์ภายในเซลของมันสำปะหลังจะมีอยู่มากก็ตาม แต่ก็ยังไม่สามารถที่จะลดหรือกำจัดพิษทั้งหมด ของไซยาไนด์ได้ (Okafor, 1977)

การหมักมันสำปะหลังเพื่อทำการินั้น นอกจากจะทำให้ได้กลิ่นรสที่ดีแล้ว ยังพบว่าสามารถลดพิษไซยาไนด์ระหว่างการหมักได้ด้วย ซึ่งสมัยก่อนเคยคิดว่า การลดพิษเกิดขึ้นเนื่องจากกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักตามธรรมชาติ แต่ต่อมา Wood (1966) พบว่าลินามารินยังคงสภาพอยู่ได้ในกรดอ่อนที่มีอุณหภูมิถึง 100 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงไม่น่าเป็นไปได้ว่าการลดพิษเกิดขึ้นจากกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากการหมักโดยจุลชีพ

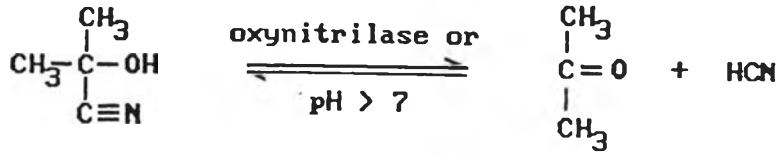
ต่อมาได้มีการศึกษา พบว่าการเติมเอนไซม์ลินามาเรสจากภายนอกเข้าไป จะสามารถลดความเป็นพิษในมันสำปะหลังหมักที่ใช้ในการทำอาหารหมักการิ ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของชาวอัฟริกันได้ Ikediobi และ Onyike (1982 a,b) ได้ทำการทดลองวัดปริมาณไซยาไนด์ในมันสำปะหลังหมักการิ ที่เวลาต่างๆกัน พบว่าใน 24 ชั่วโมงแรก จะมีไซยาไนด์อิสระเกิดขึ้นมาก ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ลินามาเรสในมันสำปะหลังเอง แต่ก็จะค่อยๆ ลดลงมาในช่วงวันหลังๆ ซึ่ง pH ในช่วงนี้ ก็จะเริ่มต่ำลงมาด้วย ทำให้ไม่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ในมันสำปะหลัง เมื่อทดลองเติมเอนไซม์ลินามาเรสจากภายนอกเข้าไปในมันหมัก พบว่าจะสามารถลดพิษ ไซยาไนด์ไปได้ถึง 8 เท่า ขณะที่เมื่อไม่มีการเติมเอนไซม์เข้าไปจะสามารถลดปริมาณไซยาไนด์ได้ประมาณ 2 เท่า ของ ไซยาไนด์ เริ่มต้น ซึ่งตามปกติแล้ว การหมักมันเพื่อทำการิ จะใช้เวลาประมาณ 4 - 5 วัน แต่ถ้ามีการเติมเอนไซม์จากภายนอกเข้าไปจะช่วยย่นระยะเวลาให้เหลือเพียง 24-36 ชั่วโมงเท่านั้น

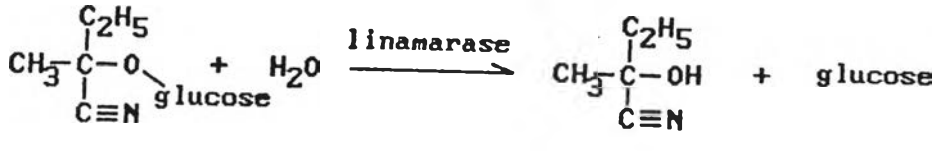
เอนไซม์ลินามาเรส (linamarase, EC 3.2.1.21)

เอนไซม์ลินามาเรส เป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) ชนิดหนึ่งทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบ ไซยาโนเจนิคกลูโคซายด์ ลินามารินและโลทอสตราลิน ให้ได้เป็นกลูโคสและสารประกอบไซยาโนไฮดริน (cyanohydrin) ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียรต่ำ สามารถแตกตัวต่อไปได้เป็นกรดไฮโดรไซยานิค(HCN)โดยอาศัยเอนไซม์ออกซินิตริเลส (Oxynitrilase) หรือในสภาวะที่เป็นด่างดังนี้

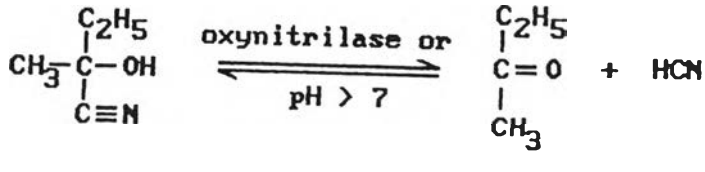


LINAMARIN





LOTAUSTRALIN



Butler และคณะ (1965) ได้ทำการสกัดแยกเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ออกจากพืช และจุลชีพบางชนิด และนำมาย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆ ดังแสดงใน ภาคผนวก ช พบว่า เบต้า-กลูโคซิเดสทุกชนิดที่ทำการศึกษาจะสามารถย่อยสลาย ซาลิซิน (Salicin),อาร์บูติน (Arbutin) อะมิกดาลิน (Amygdalin) และเซลโลไบโอสได้ แต่มีเพียงบางชนิดที่สามารถย่อยสลายลินามารินและโลทอสตราลินได้ด้วย ซึ่งเอนไซม์พวกหลังนี้ จะเรียกว่าเป็นเอนไซม์ลินามาเรส

จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่สามารถย่อยสลาย เบต้า-กลูโคซายด์ จะไม่สามารถย่อยสลายเซลโลไบโอส ซึ่งเป็นน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล ต่อกันด้วยพันธะเบต้าหรือเบต้า-ไดแซคคาไรด์ได้ (β-disaccharide) แสดงว่ามีความแตกต่างกันระหว่างแอคติวิตีของ เบต้า-ไดแซคคาไรเดส และ เบต้า-กลูโคซิเดส (Butler 1965 และ Cooke,1978)

นอกจากนี้ Butler (1965) ยังเสนอว่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ ลินามาเรสนี้อาจขึ้นกับโครงสร้างของอะไกลโคน หรือ ความเกะกะของโครงสร้าง (Steric effect) นั่นเอง

แหล่งของเอนไซม์ลินามาเรส

ได้มีผู้ทำการศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสจากแหล่งต่างๆ ซึ่งแบ่งออกได้ดังนี้

ก. ลินามาเรสที่ได้จากพืช

Butler และคณะ (1965) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ได้จากพืช หลายชนิด ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการย่อยสลายลินามาริน และโลทอสตราลินได้จำกัด ยกเว้นเบต้า-กลูโคซิเดสที่ได้จากต้น White Clover และ linseed ที่สามารถย่อยสลาย ลินามารินได้อย่างสมบูรณ์

Cooke (1978) ศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากพืชมันสำปะหลังโดยจะพบ เอนไซม์นี้ ทั้งในส่วนของพาเรนไคมาเซลล์ และเปลือกของมันสำปะหลัง และได้ทำการแยก เอนไซม์ออกมาทำให้บริสุทธิ์ รวมทั้งศึกษาสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากมันสำปะหลัง ด้วย

Boersma และคณะ (1983) ทำการศึกษาลินามาเรสและเบต้า-กลูโคซิเดส อื่นๆ ในต้น Trifolium repens พบว่าการควบคุมการทำงานของลินามาเรสเกิดขึ้นจาก gene Li ขณะที่ เบต้า-กลูโคซิเดสตัวอื่นไม่ขึ้นกับ gene Li

Kakes (1985) ศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสและเบต้า-กลูโคซิเดสชนิดอื่น ในใบของ Trifolium repens และพบว่าเอนไซม์เหล่านั้นจะอยู่ที่ผนังเซล (Cell wall) ของใบโดยเฉพาะเซลที่อยู่ในชั้นของอิพิเดอร์มิส (epidermal cell)

Hughes และคณะ (1985) ได้ทำการศึกษาพบว่าลินามาเรสแอกติวิตีที่ได้จากพืช white clover มีระดับลดลง ซึ่งเกิดจากองค์ประกอบส่วนหนึ่งที่อยู่ภายในผังของ Li locus ที่แบ่งเป็น 4 หน่วย

Fan และ Conn (1985) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส 2 ชนิด คือ ลินามาเรส และไลนัสตาติเนส (Linustatinase) จากเมล็ดของ Linum usitatissimum พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ทำงานได้ดี กับสับสเตรทที่มีอะไกลโคนจำเพาะ แล้วยังมีความจำเพาะต่อผันธะเบต้าด้วย คือไลนัสตาติเนสจะสามารถย่อยสลายเบต้า-บิส-กลูโคซายด์ที่ตำแหน่ง 2,6 และ 1,3 ของ ไลนัสตาดินได้ ขณะที่ลินามาเรสซึ่งเป็น เบต้าโมโนกลูโคซิเดสจะสามารถย่อยสลายสับสเตรทไลนัสตาดินได้น้อยมาก

Eksittikul (1986) ได้ทำการศึกษาลินามาเรสจากมันสำปะหลัง พบว่าจะมีลินามาเรสมากบริเวณรากและลำต้น แต่จะมีในใบน้อยกว่า เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 600,000 ดาลตัน หน่วยย่อยของเอนไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุล 63,000 ดาลตันและลินามาเรสจากมันสำปะหลังมี 3 ไอโซไซม์ ที่มีค่า pI เท่ากับ 4.2-4.3, 3.3-3.6 และ 2.8-2.9

Itoh - Nashida และคณะ (1987) ศึกษาการทำเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากต้นถั่ว butter bean (Phaseolus lunatus) ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต,อะซิโตน และผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม-เซฟาเดกซ์ และดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ รวมทั้ง เซฟาเดกซ์จี-200 ซึ่งทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 11,700 เท่า และพบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ถึง 4 ชนิด คือ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส,เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส,เบต้า-ดี-ฝิวโคซิเดสและเบต้า-ดี-ไซโลซิเดส

Frehner และ Conn (1987) ได้ทำการวิเคราะห์ Mesophyll protoplast และผนังเซลที่แยกออกมาจากใบของ ต้นถั่วปากอ้า Costa Rican Lima Bean (Phaseolus lunatus L.) และพบว่าลินามาเรสแอคติวิตี้อยู่ที่ apoplast แต่พบลินามารินและเอนไซม์ไฮดรอกซีไนตริล ไลเอส อยู่ที่ภายในของเซล

Sehnar และคณะ (1987) ได้ทำการศึกษา เอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากพืช Hevea brasiliensis ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะ (non-specific) พบว่าจะมีแอคติวิตีที่สามารถย่อยสลาย เบต้า-กลูโคซายด์, เบต้า-กาแลคโตซายด์ และลินามารินได้ด้วย ซึ่งคิดว่าแอนไซม์นี้น่าจะเป็น เบต้า-ไกลโคซิเดส (β-glycosidase) มากกว่า เบต้า-กลูโคซิเดส

ข. ลินามาเรสที่สร้างจากจุลชีน

Okafor และ Ejiofor (1985) ได้ศึกษาเอนไซม์ลินามาเรส ที่ได้จากแบคทีเรีย Leuconostoc mesenteroides และพบว่าจะมีการสร้างเอนไซม์เมื่อมีตัวกระตุ้นคือ ลินามาริน

Ikediobi และคณะ (1985) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากรา 2 ชนิด คือ Aspergillus sydowi และ Fusarium equiseti และพบว่าการสร้างเอนไซม์จากเชื้อราทั้งสองชนิดใช้ surfactants คือ Tween-80 และ Triton x-100 เป็นตัวกระตุ้น ขณะที่ลินามาริน และพาราไนโตรฟินิล เบต้า-ดี-กลูโคซายด์ (PNPG) สามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ได้น้อยกว่า

Padmaja และ Balagopal (1985) ได้ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบไซยาไนด์โดยเชื้อรา Rhizopus oryzae พบว่าการกระตุ้นด้วยลินามารินและโปตัสเซียมไซยาไนด์ จะสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้มากกว่าเมื่อไม่มีการกระตุ้น และไซยาไนด์ที่ได้จากการย่อยสลายลินามารินในมันสำปะหลัง ยังสามารถนำไปใช้ในเมตาบอลิสม ของ R. oryzae ได้ เพราะสามารถพบ R. oryzae เจริญอยู่ในสภาวะที่มีไซยาไนด์ สูงได้

Okafor และ Ejiofor (1986) ได้ทำการคัดแยกจุลชีนที่สามารถย่อยสลายลินามารินจากแหล่งต่างๆ และพบว่ามีเชื้อเนียง 7 ชนิด (species) จาก 50 เชื้อ ที่สามารถย่อยสลายลินามารินได้ ซึ่งเป็นเชื้อรา 3 ชนิด Fusarium oxysponum, Aspergillus flavus และ Aspergillus niger แบคทีเรีย 2 ชนิด คือ Leuconostoc mesenteroides และ Alcagenes faecalis และยีสต์ 2 ชนิดคือ Saccharomyces ceraevisiae และ Rhodotorula minuta เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายลินามารินในมันสำปะหลังพบว่า Saccharomyces sp จะย่อยสลายได้ดีที่สุดในช่วงเวลา 80 ชั่วโมง ขณะที่ Leuconostoc sp ใช้เวลาถึง 96 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า Saccharomyces ยังสามารถทนต่อไซยาไนด์ ได้ดีกว่า Leuconostoc ด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสที่แยกได้จากยีสต์ ทั้งวิธีการสกัดแยกเอนไซม์ การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากยีสต์

Ikediobi และคณะ (1987) ศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากเชื้อรา Fusarium equiseti และพบว่าที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (enzyme catalytic site) จะประกอบด้วย หมู่คาร์บอกซิลของแอสปาเทต หรือกลูตาเมต (carboxyl group of aspratate or glutamate) , หมู่อิมิดาโซลของ ฮีสติดีน (imidazole group of histidine) และหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของซิสเตอีน (Sulphydryl group of cysteine) นอกจากนี้แอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกยับยั้งโดยรีเอเจนต์ที่มีหมู่ไทออล (Thiol) เช่น ไอโอโดอาซิเตต (iodoacetate) พาราไฮดรอกซีเมอร์คิวรีเบนโซเอต (p-hydroxy mercuribenzoate) แสดงว่าอาจมีหมู่ซัลฟ์ไฮดริล ที่ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์

วัตถุประสงค์ในการวิจัย

จากรายงานที่พบว่า เมื่อมีการเติมลินามาเรสจากภายนอกเข้าไป จะทำให้ความสามารถในการลดพิษไซยาไนด์ในมันสำปะหลังเพิ่มขึ้น (Ikeiobi และ Onyike, 1982 a) และแหล่งของเอนไซม์ลินามาเรสนั้นหาได้จากทั้งพืชและจุลชีพแต่เอนไซม์ที่ได้จากจุลชีพจะมีข้อได้เปรียบกว่าเอนไซม์ที่ได้จากพืช โดยเฉพาะในแง่ของการผลิตที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้โดยไม่ขึ้นกับสภาวะอากาศ และจะผลิตมากเท่าใดก็ได้ขึ้นกับกำลังผลิตของโรงงาน ในงานวิจัยนี้ จึงมุ่งศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากจุลชีพ โดยเฉพาะยีสต์ เนื่องจากมักจะพบจุลชีพหลายชนิดในอาหารหมักมันสำปะหลัง ซึ่งสามารถทนต่อสารพิษไซยาไนด์ได้ แสดงว่าจุลชีพเหล่านั้น น่าจะมีการสร้างเอนไซม์ลินามาเรส เพื่อย่อยสลายสารประกอบไซยาไนด์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา ที่พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ลินามาเรสจากรา (Ikediobi, 1987) และแบคทีเรีย (Okafor และ Ejiofor, 1985) และได้ทำการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์เหล่านี้มาบ้างแล้ว นอกจากนี้ก็มีรายงานว่ามียีสต์บางตัวในมันหมัก ที่สามารถย่อยสลายลินามารินได้ (Okafor และ Ejiofor, 1986) แต่ยังไม่มีการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากยีสต์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากยีสต์ ทั้งในแง่ของการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ลินามาเรส การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากยีสต์ เพื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์จากแหล่งอื่น

ขั้นตอนการวิจัย

1. แยกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลังหมักจากชนิดขมและชนิดหวาน

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลินามาเรสได้แอคติวิตีสูง

   2.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

      2.1.1. แปรชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

      2.1.2. แปรชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

      2.1.3. ศึกษาผลของสารบางชนิดเช่น โปแตสเซียมไซยาไนด์และสารลดแรงตึงผิวต่อการสร้างเอนไซม์ลินามาเรส

016389

2.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

2.3 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4 ความเร็วรอบของการเขย่าเพื่อให้อากาศ

3. การทำเอนไซม์ลินามาเรสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและคอลัมน์โครมาโตกราฟี

4. ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ลินามาเรส

4.1 Km ของเอนไซม์ลินามาเรสต่อสับสเตรทลินามารินและพาราไนโตรฟีนิลเบต้าดีกลูโคซายด์ (PNPG)

4.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

4.4 ความเสถียรของเอนไซม์ ต่ออุณหภูมิ

4.5 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

1. สามารถผลิตเอนไซม์ลินามาเรสจากยีสต์

2. เรียนรู้สมบัติบางอย่างของเอนไซม์ลินามาเรสที่ได้จากยีสต์เพื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ลินามาเรสจากแหล่งอื่น

3. ได้ข้อมูลเบื้องต้นเพื่อประกอบการนำลินามาเรสที่สกัดจากยีสต์ แล้วทำให้บริสุทธิ์ ไปใช้ลดสารพิษไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง