เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร, เรื่องการปลูกมันสาปะหลัง , เอกสารทางวิชาการที่ 15, 2519

พินิธ ศุภนิพัฒน์, "ปัญหามันสำปะหลัง," วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 7, หน้า 61-69, 2517.

รายงานการสัมมนา การใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลัง, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2526.

รติยา จันทรเทียร, "การเพิ่มโปรตีนโดยใช้เชื้อรา Cephalosporium eichhorniae และลดสารพิษไซยาไนด์ในมันสำปะหลังแบบหมักแห้ง," วิทยานิพนธ์บริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2529.

เอกสารเศรษฐกิจการเกษตร, "มันสำปะหลังกับการเลี้ยงสุกร," เลขที่ 82, กองวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2526.

Abalaka, J.A., and S.A. Garba., "Influence of Media Composition on Linamarase Production by Some Fungi," Agric. Biol. Chem., 53(2), 561-563, 1989.

Akinrele, I.A., "Fermentation of Cassava," J. Sci. Food Agric., 15, 589-594, 1964.

Andrew, P., "Estimation of the Molecular Weights of Proteins by Sephadex Gel Filtration," Biochem J., 91, 222-223, 1964.

Boersma, P., P. Kakes, A.W. Schram, "Linamarase and β-Glucosidase Activity in Natural Population of Trifolium repens," ACTA BOT. NEERL, 32(1-2), 39-48, 1983.

Bolhuis, G.G., "The Toxicity of Cassava Root," Neth. J. Agric. Sci., 2, 176-185, 1954.

Butler, G.W., R.W. Barley and L.D. Kennedy, "Studies on the Glucosidase 'Linamarase'," Phytochemistry, 4, 369-381, 1965.

Butler, G.W. and B.C., Butler, "Biosynthesis of Linamarase and Lotaustralin in white clover," Nature, 187, 780-781, 1960.

Cassava/Nutrition Project, Annual Report, KKU-JDRC, 1979.

Conn, E.E., "Cyanogenic Glucosides," J. Agric. Food Chem., 17(3), 519-526, 1969.

Conn, E.E., G.W., Butler, "Perspectives in Phytochemistry," Chap. 2, p. 47-74, J. B. Harborne and T. Swain, Eds., Academic Press, London, 1969.

Conn, E.E., T. Akazawa, "Biosynthesis of p-hydroxybenzaldehyde," Federation Proc., 17, 205, 1958.

Cooke, R.D., "Purification of Cassava Linamarase," Phytochemistry, 17, 381-383, 1978.

Cooke, R.D., "An Enzymatic Assay For the Total Cyanide Content of Cassava (Manihot esculenta Crantz)," J. Sci. Food Agric., 29, 345-352, 1978.

Cooke, R.D., "Enzymatic assay for Determining the Cyanide Content of Cassava and Cassava Products," Cassava Information Center, Series 05EC-6, 1979.

Cooke, R.D. and D.G. Coursey, "Cassava : A Major Cyanide-containing Food Corp.," Cyanide in Biology. (Vennesland, B. et al, eds.) Academic Press Inc., (London), Ltd., 1981.

Cooke, R.D., and E.N. Maduagwu, "The Effects of Simple Processing on the Cyanide Content of Cassava Chips," J. Fd. Technol.,

13, 299-306, 1978.

Dey, P.M., "Polymorphism of Some Glycosidase from Barley," Phytochemistry, 16, 323-325, 1977.

Ejiofor, M.A.N. and N. Okafor, "Comparison of Pressed and Unpressed Cassava Pulp for Gari Making," IDRC, Canada-010e, 154-158, 1981.

Eksittikul, T., "Purification and Characterization of Linamarase from Cassava (Manihot esculenta Crantz)," M.Sc. Thesis in Biochemistry. Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 1986.

Frehner, M. and E.E. Conn., "The Linamarase β-Glucosidase in Costa Rican Lima Bean (Phaseolus unnatus L.) is Apoplastic," Plant Physiol., 84, 1296-1300, 1987.

Fan, T.W.M. and E.E. Conin, "Isolation and Characterization of Two Cyanogenic β -Glucosidases from flax Linum usitatissimum seed," Arch. Biochem. Biophys., 243, 361-373, 1985.

Fernandez, R. and R.D. Cooke, "Research in Costa Rica : The Effects of Cassava Processing on Residual Cyanide contents," Cassava Newsl., 4, 10-11, 1978.

Gander, J.E., "In Vivo Biosynthesis of Glycosidic Cyanide in Sorghum," Federation Proc., 17, 226, 1958.

Grover, A.K. and Cushley, R.J., "Studies on Almond Emulsin β-D-glucosidase," Biochem. Biophys. Acta, 482, 109-124, 1977.

Hughes, M.A., "Studies on β -Glucosidase Production in cultured tissue of T. repens L.," J. Exptl Bot, 19, 427-434, 1968.

Hughes, M.A., M.A. Dunn, J.R. Pearson, "A Regulatory Element Controlling the Synthesis of the Cyanogenic Glucosidase Linamarase of White Clover Trifolium repens," Heredity, 55(3), 387-392, 1985.

Ikediobi, C.O., E. Onyike, "Linamarase Activity and Detoxification of Cassava (Manihot esculenta) during Fermentation for Gari Production," Agric. Biol. Chem., 46(6), 1667-1669, 1982 a.

Ikediobi, C.O., E. Onyike, "The Use of Linamarase in Gari Production," Process Biochem., 17(4), 2-5, 1982 b.

Ikediobi, C.O., E. Onyike, and A.I. Ukoha, "Production of Linamarase by Aspergillus sydowi and Fusarium equiseti," Process Biochem., 20, 99-102, 1985.

Ikediobi, C.O., S. Ibrahim, and A.I. Ogbonna, "Linamarase from Fusarium equiseti," App. Microbiol. Biotechnol., 25, 327-333, 1987.

Itoh-Nashida ,T., M. Hiraiwa and Y. Uda, "Purificaiton and Properties of β -D-Glucosidase (Linamarase) from the Butter Bean, Phaseolus lunatus," J. Biochem., Tokyo, 101 (4), 847-854, 1987.

Kakes, P., "Linamarase and Other beta Glucosidase are Present in the Cell Walls of Trifolium repens leaves," Planta (Berl), 166(2), 156-160, 1985.

Ketiker, A.O., I.O. Akinyele, O.O. Keshinro, O.O Akinnaw, "Change in Hydrocyanic Acid Concentration During Traditional Processing into 'Gari' and 'Latum'," Food Chemistry, 3,221-228, 1978.

Kinoshita, S., S. Picyangkura and C. Buddhikant, "Isolation of Linamarase Degradating Organisms," I.C. Biotech., 11, 358-359, 1988.

Kisamanon, P., "Some Structure Characteristics of Linamarase from Cassava (Manihot esculenta Crantz)," M.Sc. Thesis in Biochemistry, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 1989.

Lehninger, A.L., Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc., New York, 1982.

Lodder, J., the Yeasts : A Taxonomic Study, 2nd revised and Enlarged Edition, North-Holland Publishing Company, 1970.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.

McIlvaine, T.C., "A Buffer Solution for Colorimetric Comparison," J. Biol. Chem., 49, 183-186, 1921.

Mao, C.H. and L. Anderson, "Cyanogenesis in Sorghum vulgare-III : Partial Purification and Characterization of Two β-Glucosidase from Sorghum Tissues," Phytochemistry, 6, 473, 1967.

Maher, E.P. and M.A. Hughes, "Isolation of Linamarase-Lotaustralin from Trifolium repens," Phytochemistry, 10, 3005-30070, 1971.

Nambisan B., and S. Sundaresan, "Plant toxin : Spectrophotometric Determination of Cyanoglucosides in Cassava," J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67(3), 641-643, 1984.

Okafor, N., "Microorganisms Associated with Cassava Fermentation for Gari Production," J. Appl. Bacteriol., 42, 279-284, 1977.

Okafor, N. and M.A.N. Ejiofor, "The Linamarase of Leuconostoc mesenteroides : Production, Isolation and Some Properties," J. Sci. Food Agric., 36, 669-678, 1985.

Okafor, N. and M.A.N. Ejiofor, "The Microbial Breakdown of Linamarin in Fermenting Pulp of Cassava (Manihot esculenta Crantz)," MIRCEN J., 2(2), 327-338, 1986.

Oke, O.L., "Chemical Studies on Some Nigerian Food Stuff "Garri"," Nature, 212, 1055-1056, 1966.

Oke, O.L., "The Mode of Cyanide Detoxification," In Chronic Cassava Toxicity IDRC., 97-104, 1973.

Padmaja, G. and C. Balagopal, "Cyanide Degradation by Rhizopus oryzae," Can. J. Microbiol., 31, 663-669, 1985.

Product Information Biochemical (BDH), "Linamarase for the Enzymatic Determination of Linamarin (Linamarin- β -D-Glucohydrolase : EC 3.2.1.21)"

Rogers, D.J. and Appur, S.G., Flora Neotropica, Monograph No. 13, "Manihot manihotoides (Euphorbiaceae)," Hafner Press, New York, 1973.

Sehnar, D., R. Leiberei, B. Biehl and J. Voigt, "Hevea Linamarase-A Nonspecific β -Glucosidase," Plant Physiol.,

83, 557-563, 1987.

Somerlate, B.M., S.D. Olzany and P.A.J. Rezende, "Production of β-D-Galactosidase from Linyveromyces fragilis Grown in Cheese Whey," J. Dairy Sci., 68, 1618-1623, 1987.

Supelco "Chromatography Products, Published by Supelco, Inc., International Catalog 27, 196-199, 1989.

Tinay, A.H., P.L. Buring and E.A.E. Yas., "Hydrocyanic Acid Level in Fermented Cassava," J. Fd. Technol., 19, 197-202, 1984.

Vannesland, B., P.A. Castric, E.E. Conn, L.P. Solomonson, M. Volini, J. Westley, Cyanide Metabolism Summary of minisymposium presented at the 72 nd annual meeting of the American Society of Biological Chemists, St. Louis Missouri, June 4, 1981, Fred. Proc., 41, 2639-2648, 1981.

Wiils, C., T. Martin, T. Melham and D. Walker, "Alcoihol dehydrogenase II and Fructose-1,6-bis phosphatase Appear to be Co-regulated in Wilde-Type Yeast," FEBS Lett., 183, 155-160, 1985.

Williams, D.E. and R.A. Reisfeld, "Disc Electrophoresis in Polyacrylamide Gels Extension to New Conditions of pH and Buffer," N.Y. Acad. Annals, 121(2), 373-375, 1964.

Wood, T., "The Cyanogenic Glucosidase Content of Cassava and Cassava Products," J. Sci. Fd. Agric., 16, 300-305, 1965.

Wood, T., "The Isolation, Properties, and Enzymatic Breakdown of Linamarin from Cassava," J. Sci. Fd. Agric., 17, 85-90, 1966.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อวายเอ็ม (YM, Yeast Malt extract medium)

ผงสกัดยีสต์	0.3%
ผงสกัดมอลท์	0.3%
แบคโตเปปโตน	0.5%
กลูโคส	1.0%

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อชาเพคดอกซ์ (Czapek's dox medium)

โซเดียมไนเตรท	3 กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5 กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์	0.5 กรัม
เหล็กซัลเฟต ($FeSo_4.7H_2o$)	0.01 กรัม
กลูโคส	30 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ (NA, Nutrient agar)

ผงสกัดเนื้อ (Beef extract)	0.3%
แบคโตเปปโตน	0.5%
วุ้น	1.5%

ละลายน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการจำแนกเชื้อยีสต์

4.1. Fermentation medium

ยีสต์เอกซ์แทรก	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลายให้เข้ากันและแบ่งใส่หลอดเกลียว ที่มีหลอดดูแรม หลอดละ 4.5 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ 15 นาที เติม 0.5 มล ของ 20% น้ำตาล ที่ผ่านการกรองเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ ลงในแต่ละหลอด (ยกเว้น ราฟิโนสจะเติม 0.1มล.) น้ำตาลที่ใช้ในการทดสอบการหมักได้แก่

กลูโคส, กาแลคโตส, ซูโครส, มอลโตส, แลคโตส, เมลิไบโอส, ราฟิโนส

4.2. อาหารเหลวสำหรับตรวจดูการใช้แหล่งของไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (Nitrogen assimilation medium)

ยีสต์คาร์บอนเบส	11.7	กรัม
โปตัสเซียมไนเตรท	0.78	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปกรองเพื่อให้ปราศจากเชื้อ เติมลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มล. และปิดจุกด้วยสำลีเพื่อให้มีอากาศผ่านได้

4.3. อาหารเหลวสำหรับตรวจดูการใช้แหล่งของคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (Carbon assimilation medium)

ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
แหล่งของคาร์บอน	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกันและทำให้ปรากศจากเชื้อโดยการกรอง ดูดมา 1 มล. เติมลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 ml และปิดจุกด้วยสำลี เพื่อให้มีอากาศผ่านได้

แหล่งของคาร์บอนที่ใช้ : กลูโคส, กาแลคโตส, ซูโครส, มอลโตส, เมลิไบโอส ราฟฟิโนส และแลคโตส (ราฟฟิโนสจะใช้ความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของกลูโคส)

4.4. อาหารเหลวที่ไม่มีวิตะมิน (Vitamin-Free medium)

ยีสต์เบสที่ปราศจากวิตะมิน	16.7	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลายให้เข้ากันและกรองเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ 1 ดูดมา 1 มล. เติมลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มล.

4.5. อาหารแข็งวุ้นเอียง โกรอดโควา (Gorodkowa slant)

กลูโคส	0.1	กรัม
แบคโต-เปปโตน	1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม
วุ้น	2	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดละ 7 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที แล้วนำมาเอียง

4.6. อาหารแข็งวุ้นเอียงโปแตสเซียมอะซิเตด (Potassium acetate slant)

โปตัสเซียมคลอไรด์	0.82	กรัม
โซเดียมอะซิเตด	0.18	กรัม
กลูโคส	0.05	กรัม
ผงสกัดยีสต์	0.1	กรัม
วุ้น	1.5	กรัม

ละลายในน้ำ 100 มล. แบ่งใส่หลอดละ 7 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที แล้วนำมาเอียง

ภาคผนวก ข

รีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดลอง

1. รีเอเจนต์สำหรับตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และวัดปริมาณไซยาไนด์

- สารละลายลินามาริน

ชั่ง 36 มก. ลินามารินบริสุทธิ์จากบริษัท Sigma ละลายใน 30 มล. ของ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

- สารละลายคลอรามิน - ที (Chloramin T.)

ละลาย 0.5 กรัมของ คลอรามิน ที ในน้ำกลั่น 100 มล. (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำ)

- สารละลายไพริดีน - ไพราโซโลน

0.2 กรัม บิสไพราโซโลน

1 กรัม ของ 3-เมธิล - 1 ฟีนิล-5 ไพราโซโลน

ละลายใน 200 มล.ไพริดีน โดยต้องเตรียมใหม่ ทุก 3 วัน และเก็บในขวดสีน้ำตาลเพื่อป้องกันแสง

2. รีเอเจนต์สำหรับวัดปริมาณโปรตีน

สารละลายลอว์รี - เอ (Lowry A)

โซเดียมไบคาร์บอเนต	60	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	12	กรัม
โซเดียม-โปตัสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
ละลายในน้ำ	3,000	มล.

สารละลายลอว์รี - บี (Lowry B)

คอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม ในน้ำ 1,000 มล.

สารละลายลอว์รี - ซี (Lowry C)

สารละลายลอว์รี-เอ 50 ส่วน ผสมกับสารละลายลอว์รี-บี 1 ส่วน

สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์

สารละลาย โฟลิน - ฟีนอลรีเอเจนต์ 1 ส่วน ต่อน้ำกลั่น 1 ส่วน

3. รีเอเจนต์สำหรับการทำโพลีอาคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซีส (Polyacrelamide gel electrophoresis(Williams and Reisfeld 1964)

3.1 สารเคมีสำหรับเซพาเรติงเจล (Seperating gel)

7.5% อะครีลาไมด์, 0.18% บิส (N,N-methylenebis acrylamide) pH8.9

สารละลายตั้งต้น (Stock solution)

ก) 1 นอร์มอลไฮโดรคลอริก 48 มล.
ทริส(Tris(hydroxymethyl)aminomethane) 36.3 กรัม
TEMED (N,N,N,N Tetramethylethylenediamine) 0.23 มล.
เติมน้ำให้ครบ 100 มล. ปรับ pH ให้ได้ 8.8-9.0

ข) อะครีลาไมด์ (Acrylamide) 28 กรัม
Bis 0.735 กรัม
ละลายในน้ำ 100 มล. เก็บในขวดสีดำที่ 4 C

ค) แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.14 กรัม ละลายในน้ำ 100 มล. โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้

สารละลายที่ใช้ (Working solution)

ผสมสารละลาย ก. 1 ส่วน ข. 1 ส่วน และ ค. 2 ส่วน

3.2 สารเคมีสำหรับสแตกกิงเจล (Stacking gel)

(ส่องภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์เพื่อทำให้เกิดการโพลีเมอไรซ์)

สารละลายตั้งต้น (Stock solution)

ก) ทริส 5.98 กรัม
TEMED 0.46 มล.
เติมน้ำให้ครบ 100 มล. ปรับ pH ให้เป็น 6.7 ด้วย 1 นอร์มอลไฮโดรคลอริก

ข) อะครีลาไมด์ 10 กรัม
บิส 2.5 กรัม
เติมน้ำให้ครบ 100 มล.

ค) ไรโบฟลาวิน 4.0 มก.
ละลายน้ำให้เป็น 100 มล.

ง) ซูโครส 40 กรัม ในน้ำ 100 มล.

3.3 สารละลายบัฟเฟอร์ pH 8.3

ทริส 3.0 กรัม

ไกลซีน 14.4 กรัม

เติมน้ำให้ครบ 1,000 มล. ปรับ pH ได้ 8.3

3.4 สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining solution)

0.23% โคแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250 (Comassie brilliant blue G-250)

10% กรดอาซิติก

49% เมธานอล

3.5 สารละลายสำหรับล้างสี (Destaining solution)

7% กรดอะซิติก

30% เมธานอล

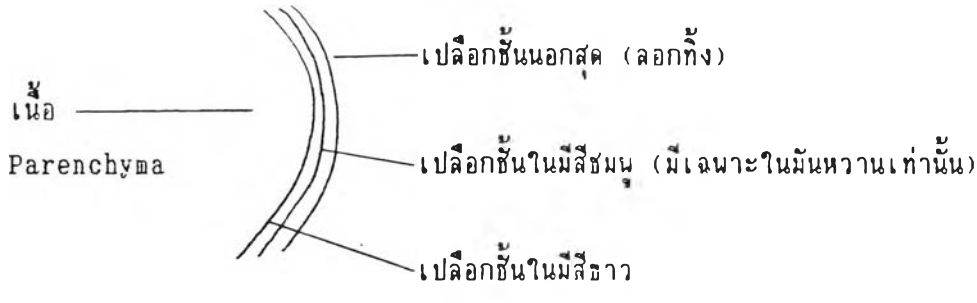
ละลายในน้ำกลั่น 2 ลิตร

ภาคผนวก ค

การเตรียมลินามารินจากเปลือกมันสำปะหลัง

1. การสกัดลินามารินออกจากมันสำปะหลัง โดยปรับปรุงจากวิธีของ Nambisan และ Sanderesan (1984)

โดยนำมันสำปะหลังสดมาปอกเปลือกเอาเฉพาะเปลือกชั้นใน ดังรูป (ในมันสำปะหลังชนิดหวานจะเอาเฉพาะส่วนเปลือกชั้นใน ที่มีสีขาวเท่านั้น สีชมพูที่อยู่ผิวนอกให้ขูดทิ้งไป เนื่องจากสารประกอบที่ทำให้เกิดสีชมพู อาจมีผลบางอย่างต่อเชื้อ ที่จะทดสอบ และสีนี้อาจรบกวนค่าการดูดกลืนแสงเมื่อนำไปใช้เป็นสับเสตรทในการวัดแอคติวิตี ของเอนไซม์ แต่สำหรับมันขมจะไม่มีผิวสีชมพู จึงใช้เปลือกชั้นในได้ทั้งหมด)



นำเปลือกมันที่ได้ปั่นรวมกับ 80% เอธานอลที่ 60 องศาเซลเซียสในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อ 2 มล. โดยใช้เครื่องปั่นที่ความเร็วสูง 10,000 x g 10 นาที นำส่วนน้ำใส ที่ได้ไปกลั่นระเหยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อเอาเอธานอลออกจนมีปริมาตรเหลือ ประมาณ 1 ใน 4 ของปริมาตรเริ่มต้น สารละลายที่ได้นี้เรียกว่าลินามารินสกัด (linamarin extract)นำไปวัดปริมาณไซยาไนด์เกาะติด (bound cyanide) หรือ ลินามารินตามวิธีในภาคผนวก ง

2. การทำลินามารินสกัดที่ได้ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น (Kinoshita et al,1988)

โดยการกวนสารละลายลินามารินสกัดที่ได้ในแอนไอออนเอกซเชนเจอร์ เป็นเวลา 20 นาที กรองเอาเฉพาะส่วนน้ำใสโดยใช้กระดาษกรอง (Whatman หมายเลข 1) แล้วนำไปกวนต่อในแคทไอออนเอกซเชนเจอร์ (แอมเบอร์ไลท์) อีก 20 นาที กรองอีกครั้งหนึ่งนำสารละลายที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้น โดยใช้เครื่องระเหยแห้ง

(Lyophilizer) แล้วนำไปผ่านเจลคอลัมน์โตโยเพิร์ล HW-40 (TOYOPEARL-HW 40) เก็บสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องเก็บลำดับส่วนหลอดละ 7 มล. ที่อัตราเร็ว 50 มล. ต่อชั่วโมง ตรวจวัดน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล - ซัลฟูริก และวัดปริมาณไซยาไนด์เกาะติดหรือลินามาริน ตามวิธีในภาคผนวก ง รวมสารละลายในหลอด ที่มีปริมาณลินามารินสูงเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นอีกครั้งโดยใช้เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) เก็บไว้ที่ - 18 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นสับสเตรท (Substate) ในการวัดแอคติวิตีของลินามาเรส ในการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ลินามาเรสตาม วิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 3

ภาคผนวก ง

1. การวัดปริมาณไซยาไนด์ ตามวิธีของ Cooke(1978)

โดยเติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณไซยาไนด์ 0.1 มล. ลงใน 0.4 มล. ของ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 เติมสารละลายเอนไซม์ลินามาเรส ประมาณ 0.3 หน่วย ซึ่งเตรียมได้จากมันสำปะหลัง (ภาคผนวก จ)0.1 มล. เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส 15 นาที หยุดปฏิกิริยา โดยเติม 0.2 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.6 มล.และวิเคราะห์หาปริมาณไซยาไนด์ ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 5 เทียบค่า OD_{620} ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของโปตัสเซียมไซยาไนด์ และคำนวณเป็น มก. ไซยาไนด์/มล. ค่าที่ได้จะเป็นปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด (total cyanide) ส่วนการวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระ (free cyanide) ทำได้โดยเติม 0.1 มล. ของ0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 แทนเอนไซม์ลินามาเรส และดำเนินการทดลองเหมือนกัน ส่วนค่าของไซยาไนด์เกาะติด (bound cyanide) หรือลินามาริน จะได้จากผลต่างของปริมาณไซยาไนด์ทั้งหมด กับไซยาไนด์อิสระ

2. การวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของลอว์รี (Lowry และคณะ 1951)

นำสารละลายที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 1.0 มล. เติมลงใน 5.0 มล. ของสารละลายผสมลอว์รี่ c (Lowry C) (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสาราละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข ข้อ 2) 0.5 มล. เขย่าทันทีแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าเป็นครั้งคราวจากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และคำนวณค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายจากกราฟมาตรฐานโปรตีนอัลบูมิน (bovine serum albumin) ที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัม

ภาคผนวก จ

การเตรียมเอนไซม์ลิพาเมาเรสจากเปลือกมันสำปะหลัง ตามวิธีของ Cooke (1978)

ใช้หัวมันสำปะหลังสดล้างให้สะอาด ลอกเอาแต่เปลือกของหัวมันทั้งเปลือกชั้นนอกและชั้นใน ตัดเปลือกมันเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.2 x 0.5 ซม. 200 กรัม ต่อ อะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.5 200 มล. ปั่นในเครื่องปั่น (Blender) ที่ความเร็วสูงสุด 3 นาที แล้วนำไปแยกตะกอนที่ความเร็ว 10000 x g 30 นาที 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสที่ได้ (ประมาณ 1600 มล.) ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ที่ 60% ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำไปแยกตะกอนที่ความเร็ว 10000 x g 1 ชั่วโมง 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 โดยใช้ปริมาตรน้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนได้หมด แล้วนำไปไดอะไลซ์ (dialyse) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (3 x 50 ปริมาตร) เก็บสารละลายที่ได้ในขวดพลาสติกที่ - 18 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวัดปริมาณไซยาไนด์ต่อไป

Cyanogenic Glycosides of Known Structure[a]

Glycoside	Sugar	Aglycone	Occurrence
Amygdalin	Gentiobiose	D-Mandelonitrile	*Prunus* Sp.
Prunasin	D-Glucose	D-Mandelonitrile	*Prunus* Sp., Many *Rosaceae* *Eucalyptus* Sp.
Sambunigrin	D-Glucose	L-Mandelonitrile	*Sambucus nigra*, *Acacia* Sp. (Australin)
Prulaurasin	D-Glucose	DL-Mandelonitrile[b]	
Vicianin	Vicianose	D-Mandelonitrile	*Vicia angustifolia* L. and other Vicia
Dhurrin	D-Glucose	L-*p*-Hydroxymandelonitrile	*Sorghum* Sp.
Taxiphyllin	D-Glucose	D-*p*-Hydroxymandelonitrile	*Taxus* Sp.
Zierin	D-Glucose	*m*-Hydroxymandelonitrile	*Zieria laevigata* Sm.
Linamarin	D-Glucose	α-Hydroxyisobutyronitrile (acetone cyanohydrin)	*Linum usitatissimum*. L.; *Phaseolus lunatus*, L.; *Trifolium repens*. L. *Lotus* Sp.. *Manihot* Sp.. *Dimorphotheca* Sp.
Lotaustralin	D-Glucose	α-Hydroxy-α Methyl Butyronitrile[c] (methylethyl ketone cyanohydrin)	(See Linamarin)
Acacipetalin	D-Glucose	β-Dimethyl-α-Hydroxyacrylonitrile	*Acacia* Sp. (South African)
Gynocardin[c]	D-Glucose	Gynocardinonitrile	*Gynocardia odorata*. R.Br. *Pangium edule*. Reinw.

ที่มา Conn, 1969

ภาคผนวก ช

β-GLUCOSIDASE ACTIVITY OF ENZYME EXTRACTS

Source of enzyme extract	Substrate	
	Linamarin/ Lotaustalin	Salicin, arbutin, amygdalin, cellobiose
Higher plants		
Trifolium repens L.		
N.Z.certified white clover leaves	+	+
Linum usitatissimum L.		
Linseed flax shoots	+	+
Almond emulsin	+	+
Photinea serrulata Lindl.		
Leaves	-	+
Sambucus nigra L.		
Elder leaves	-	+
Trifolium pratense L.		
Red clover leaves	-	+
Triticum vulgare L.	-	+
Sprouted wheat	-	+
Vicia faba L.		
Sprouted broad beans	-	+
Conium maculatum L.		
Hemlock leaves	-	+
Populus alba L.		

Poplar shoots	-	+
Micro-organisms		
Rumen protozoa (mixed bovine)	+	+
Pithomyces chartarum (Berk and Curt) M.B.Ellis. Syn.Sporidesmium bakeri(Syd.)	+	+

+Strong hydrolysis,intense glucose spot on chromatogram.

-Little or no hydrolysis,glucose not detectable on chromatogram.

ที่มา Butler และคณะ,1965

ประวัติผู้เขียน

นางสาว ชัญญา พุทธิชันธ์ เกิดเมื่อวันที่ 27 สิงหาคม พ.ศ.2508 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2530 ในระหว่างศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต มีผลงานทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับวิทยาศาสตร์ ดังนี้คือ

Kinoshita, S.,S. Pichyangkura, and C.Buddhikant,
"Isolation of Linamarin degradating organisms.,"
IC. Biotech , 11 ,358-359,1988