

สภาวะที่เหมาะสมต่อการวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระในมันสำปะหลัง
(*Manihot esculenta* Crantz)

Optimal Condition for the Free Cyanide Determination in Cassava
(*Manihot esculenta* Crantz)

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล^{1/}

ปิยะดา อีระกุลพิศุทธิ์^{2/}

Suchirat Sakuanrungsirikul^{1/}

Piyada Theerakulpisut^{2/}

ธีรวุฒิ วงศ์วัฒน์^{2/}

เพ็ญเพ็ญ ศรวัต^{1/}

Theerawut Wongwarat^{2/}

Peaingpen Sarawat^{1/}

ABSTRACT

The cyanogenic glucoside in cassava is hydrolysed by endogenous linamarase to liberate cyanide which can directly be detected from the free cyanide determination, using enzymatic method. The aim of the present study was to determine the optimal condition for hydrolysis of cyanogenic glucoside in cassava. Varying amount of plant materials, different lengths of incubation time and three methods of preparation of plant materials were investigated. Tissues of cassava were sampled from freshly harvested 12-month-old cassava. The optimal condition for the determination of free cyanide content involved grinding young leaves (0.1 g) and cassava peel (0.3 g) in liquid nitrogen before adding the extraction buffer (pH 5.0) and incubating at 50 °C for 60 minutes.

Key words : cassava, cyanogenic glucoside, free cyanide, enzymatic method

บทคัดย่อ

ไซยาไนด์ในคิงกูลโคไซด์ (cyanogenic glucoside) ในมันสำปะหลัง จะทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยเอนไซม์ลินามาเรสได้ไซยาไนด์ สามารถวัดปริมาณได้โดยตรงจากการวัดปริมาณของไซยาไนด์อิสระ (free cyanide) ด้วยเทคนิค Enzymatic method ในงานวิจัยนี้ศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่ม

1/ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น อ.เมือง จ. ขอนแก่น 40000

Khon Kaen Field Crops Research Centre, Muang district, Khon Kaen province 40000

2/ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ. ขอนแก่น 40002

Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang district, Khon Kaen province 40002

น้ำหนักของตัวอย่าง วิธีการเตรียมตัวอย่างต่อการสลายตัวของไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์เพื่อให้สามารถวัดไซยาไนด์อิสระจากมันสำปะหลังที่มีอายุ 12 เดือน พบว่า ตัวอย่างจากใบอ่อนมันสำปะหลัง น้ำหนัก 0.1 ก. และเปลือกของหัวมันสำปะหลัง น้ำหนัก 0.3 ก. นำมาเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว ก่อนเติมลงในสารละลายที่ใช้สกัด pH 5.0 แล้วบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 °ซ ที่เวลา 60 นาทีนั้นสามารถวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระสูงสุด

คำหลัก : มันสำปะหลัง ไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์ ไซยาไนด์อิสระ Enzymatic method

คำนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งใบและหัว โดยใบมันสำปะหลังนิยมนำมาทำเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ เนื่องจากมีโปรตีนและเส้นใยในปริมาณสูง ส่วนที่หัวของมันสำปะหลังก็อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต (นิรนาม, 2541; Beynum *et al.*, 1985) จึงนิยมนำมาแปรรูปเป็นอาหารทั้งของมนุษย์และสัตว์ แต่พบว่าในเนื้อเยื่อของมันสำปะหลังมีสารจำพวกไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์ซึ่งพบได้มากในใบอ่อนและเปลือก (Cardoso *et al.*, 2005) ไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์เป็นสารที่มีพิษต่อร่างกายทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอัมพาตที่ขา (Konzo) โรคคอหอยพอก (goitre) และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทพว่อง (Tropic ataxin neuropathy; TAN) (Howlett

et al., 1990; Mling *et al.*, 1992)

ไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์ที่พบในมันสำปะหลังมี 2 ชนิด คือ สารลินามาริน (linamarin) และสารลอสตาลิน (lotoaustalin) เท่ากับ 95 และ 5 % ตามลำดับ (Conn, 1979 ; Padmaja, 1995) สารดังกล่าวนี้จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ลินามาเรส (linamarase) ได้เป็นสารอะซีไตนไฮยาโนไฮดริน (acetone cyanohydrin) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นไซยาไนด์และอะซีไตน (Figure 1) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮดรอกซีไนโตรไลเอส (hydroxynitrile lyase) แต่การเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดขึ้นได้เองโดยไม่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ (spontaneous) หากอยู่ในสถานะที่มี pH > 4.0 หรืออุณหภูมิมากกว่า 30 °ซ ซึ่งเรียกว่า กระบวนการไซยาโนจีนีซิส (cyanogenesis) กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นเองภายในเซลล์พืช (McMahon *et al.*, 1995 ; Fokunang *et al.*, 2001) ในสถานะปกติไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์จะอยู่ในแวคิวโอล (vacuole) ส่วนเอนไซม์ลินามาเรสจะอยู่ในผนังเซลล์ (Mkpong *et al.*, 1990; White *et al.*, 1994) แต่หากเนื้อเยื่อถูกรบกวนจากการถูกทำลายหรือบดขยี้จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาไซยาโนจีนีซิสขึ้น สามารถวัดปริมาณไซยาไนด์ได้โดยตรงในรูปของไซยาไนด์อิสระ (free cyanide) (Ikediobi *et al.*, 1980)

การวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระในมันสำปะหลังนั้น จำเป็นต้องศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสลายตัวของไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์ไปเป็นไซยาไนด์ เนื่องจากกระบวนการไซยาโนจีนีซิสต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ลินามาเรส และ

เอนไซม์ไฮดรอกซีไนโตรลิเอส รวมทั้งกระบวนการที่เกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ดังมีรายงานผลการศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดกระบวนการไฮยาโนจีนีซิส พบว่า สารละลายที่ใช้สกัดควรมี pH ระหว่าง 4.0 - 6.0 และที่อุณหภูมิ 40 – 55 °ซ (Cooke *et al.*, 1978; Itoh-Nashida *et al.*, 1987; Yeoh, 1989; Uritani *et al.*, 1994) ปริมาณไฮยาโนดีของเปลือกมันสำปะหลังในสารละลายที่ใช้สกัด pH 5.0 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ และวิเคราะห์โดยเทคนิค Enzymatic method ให้ค่าปริมาณไฮยาโนดีสูงสุด ในสภาวะดังกล่าวน่าจะเป็นสภาวะที่เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุด (สุรินทร์และคณะ, 2546) ดังนั้นเพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมของกระบวนการไฮยาโนจีนีซิสที่ถูกต้อง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการสลายตัวของไฮยาโนจินคัลโคไซด์ เป็นไฮยาโนดีอิสระทั้งในใบอ่อนและเปลือกของหัวของมันสำปะหลัง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างพืช

ใบอ่อนและหัวมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 อายุ 12 เดือน ที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชไร่นอนแก่น

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับการวัดปริมาณไฮยาโนดีอิสระ

2.1 สารละลายบัฟเฟอร์ ประกอบด้วย

สารละลายกรดฟอสฟอริก 0.1 โมลกับสารละลายไตรโซเดียมฟอสเฟต 0.1 โมล แล้วปรับ pH เป็น 4.0 6.0

2.2 สารละลายที่ใช้สกัด ประกอบด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก 0.1 โมลกับ 95 % เอทานอล (3 : 1) ปรับ pH เป็น 5.0

2.3 สารละลาย pyridine/pyrazolone ซึ่งสาร bispyrazolone 0.2 ก. และสาร 3-methyl-1-phenol-5-pyrazolone 1 ก. ละลายในสาร pyridine 200 มล.

2.4 สารละลาย chloramine-T เตรียม chloramine-T 0.5 % (w/v) ในน้ำกลั่น

3. วิธีการ

3.1 ศึกษาการสลายตัวของไฮยาโนจินคัลโคไซด์เป็นไฮยาโนดีอิสระของตัวอย่างใบและเปลือกของหัวมันสำปะหลังหนัก 0.3 ก. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0-110 นาที

3.2 ศึกษาเปรียบเทียบการสลายตัวของไฮยาโนจินคัลโคไซด์เป็นไฮยาโนดีอิสระ โดยใช้ตัวอย่างใบและเปลือกของหัวมันสำปะหลังที่น้ำหนักต่างๆ คือ 0.1 0.3 0.5 0.7 ก.

3.3 ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่าง 3 วิธีคือ การบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวก่อนเติมลงในสารละลายที่ใช้สกัด การบดตัวอย่างด้วยแท่งพลาสติกในสารละลายที่ใช้สกัด และการใช้มีดหั่นตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กก่อนเติมลงในสารละลายที่ใช้สกัด

4. การวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระ

วิธีการที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ดัดแปลงจากเทคนิคการวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระด้วย Enzymatic method (O' Brien *et al.*, 1991; Esser *et al.*, 1993) มีขั้นตอนการทดลองดังนี้ ซึ่งใบอ่อนและเปลือกของมันสำปะหลัง 0.3 ก. หั่นเป็นชิ้นเล็กๆใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายที่ใช้สกัดปริมาตร 1 มล. ด้วย vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ นาน 60 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แล้วดูดส่วนใสปริมาตร 0.1 มล. ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.0 ปริมาตร 3.9 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย 0.5 % chloramine-T 0.2 มล. แล้วนำไปแช่เย็นในน้ำแข็งหรือที่ 4 °ซ นาน 5 นาที เติมสารละลาย pyridine/pyrazolone 0.8 มล. ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที จากนั้นให้นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยในแต่ละวิธีการดำเนินการทดลองทำ 3 ซ้ำ

5. การสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไซยาไนด์ (250 ไมโครกรัม/มล. ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมล) นำมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.0 ให้ได้ความเข้มข้นระหว่าง 0.25 ถึง 2.5 ไมโครกรัม/มล.ของสารละลายโพแทสเซียมไซยาไนด์ (เทียบเท่ากับ 0.1-1.0 ไมโครกรัมไซยาไนด์) แล้วดูดแต่ละความเข้มข้น

ที่เตรียม 0.1 มล. ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.0 เขย่าให้เข้ากัน ดำเนินการวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระตามข้อ 2

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสลายตัวของไซยาไนด์อินทรีย์โคไซด์เป็นไซยาไนด์อิสระของตัวอย่างใบและหัวมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 50 °ซ และ pH 5.0

ผลการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมต่อการสลายตัวของไซยาไนด์อินทรีย์โคไซด์จากใบอ่อนและเปลือกของหัวมันสำปะหลัง โดยการคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Figure 1) พบว่าปริมาณไซยาไนด์อิสระจากใบอ่อนของมันสำปะหลังในช่วงเวลา 0-40 นาทีนั้น (Figure 2) ปริมาณไซยาไนด์อิสระที่เวลา 0 นาทีมีค่าสูงมาก ทั้งนี้อาจเกิดจากการดูดกลืนแสงโดยสารรบกวนอื่นๆ เช่น ไธโอไซยาเนต (thiocyanate) โดยได้เคยมีรายงานพบว่าสารดังกล่าวรบกวนการวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระจากการวัดโดยใช้ Spectrophotometric method (Seto, 2002) แต่

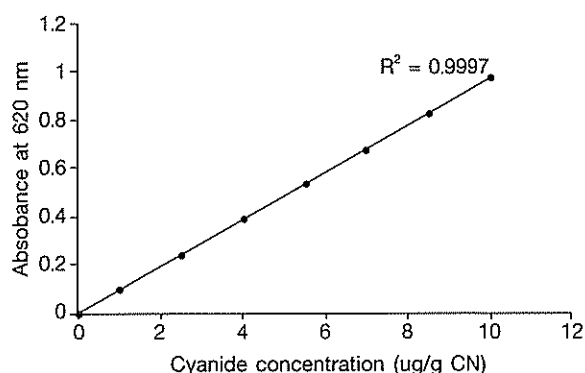


Figure 1. Standard curve for free cyanide estimation

อย่างไรก็ตาม ผลการรวบรวมจากไฮโดรไซยานิดจากการวัดปริมาณไซยาไนด์ในเห็ด พบในปริมาณน้อย (Akiyama *et al.*, 2006) ดังนั้นค่าปริมาณไซยาไนด์อิสระที่วัดได้ในช่วงเวลาตั้งแต่ 0-40 นาที จึงน่าจะเกิดจากการดูดกลืนแสงจากสารรบกวนชนิดอื่นๆ ในสารสกัด ซึ่งสลายตัวไปภายในเวลา 40 นาที ปริมาณไซยาไนด์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาตั้งแต่ 40 นาทีเป็นต้นไป จึงน่าจะเป็นปริมาณไซยาไนด์ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ลินามาเรส และกระบวนการไซยาโนจีนิซิส ส่วนปริมาณไซยาไนด์อิสระจากเปลือกของหัวมันสำปะหลังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปโดยไม่ถูกรบกวนจากสารรบกวน ซึ่งอาจเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์โรดาเนส (rhodanese) (Nambisan and Sundaresan, 1994) ทำให้ลินามาเรสไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรไซยานิด ปริมาณไซยาไนด์อิสระจากเปลือกของหัวมันสำปะหลังมีปริมาณสูงสุด และเริ่มคงที่ที่เวลา 60

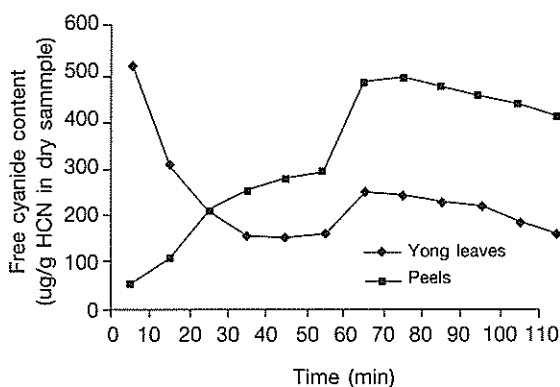


Figure 2. Free cyanide content in young leaves and peels of cassava were determined at different periods of incubation.

นาที จากนั้นที่เวลา 90 นาทีปริมาณไซยาไนด์อิสระจากเปลือกมันสำปะหลังค่อยๆลดลง เนื่องจากการเสื่อมของเอนไซม์ลินามาเรส

2. น้ำหนักของตัวอย่างต่อการสลายตัวของไซยาโนจีนิคกลูโคไซด์

การทดลองตรวจสอบว่าปริมาณตัวอย่างที่ใช้มีผลต่อการวิเคราะห์ไซยาไนด์หรือไม่ ผลการทดลองใช้ตัวอย่างใบอ่อนและเปลือกของหัวมันสำปะหลังปริมาณ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 ก. พบว่าน้ำหนักของตัวอย่างจากใบอ่อนและเปลือกของหัวมันสำปะหลังนั้น มีผลต่อการสลายตัวของไซยาโนจีนิคกลูโคไซด์เป็นไซยาไนด์อิสระ (Table 1) ตัวอย่างจากใบอ่อนของมันสำปะหลังที่น้ำหนัก 0.1 ก. สามารถวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระได้สูงสุด 387.41 ไมโครกรัม/ก. ไซยาไนด์ในน้ำหนักแห้ง และเมื่อน้ำหนักเพิ่มขึ้น ปริมาณไซยาไนด์อิสระลดลง ในขณะที่สามารถวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระ จากเปลือกของหัวมันสำปะหลังจากน้ำหนักของตัวอย่าง 0.3, 0.5 ก. เท่ากับ 429.53 และ 427.98 ไมโครกรัม/ก. ไซยาไนด์ในน้ำหนักแห้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการหาปริมาณไซยาไนด์อิสระจึงสามารถเลือกใช้น้ำหนักของเปลือกเพียง 0.3 ก. ก็เพียงพอสำหรับการทดลอง เมื่อพิจารณาน้ำหนักของตัวอย่างจากใบอ่อนและเปลือกของหัวมันสำปะหลังจากน้ำหนักที่เท่ากัน พบว่าลักษณะของพื้นที่ของตัวอย่างใบอ่อน มีการกระจายตัวของตัวอย่างหนาแน่นมากกว่า

ตัวอย่างจากเปลือกของหัวมันสำปะหลัง ดังนั้น เมื่อตัวอย่างใบอ่อนมันสำปะหลังจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นนั้น โอกาสที่จะมีพื้นที่ผิวของตัวอย่าง สัมผัสกับสารละลายที่ใช้สกัดจึงลดลงด้วย ในทาง

ตรงกันข้าม ตัวอย่างจากเปลือกของมันสำปะหลังนั้นมีพื้นที่สัมผัสมากกว่าใบอ่อนของมันสำปะหลัง จึงวัดปริมาณไซยาไนด์จากได้มากกว่าใบอ่อน

Table 1. Free cyanide content in different amount of young leaves and peels of cassava

Tissues	Weights of freshy samples (g)	Free cyanide content ($\mu\text{g HCN} / \text{g dry weight}$)
Young leaves	0.1	387.41a $\pm$ 2.40
	0.3	183.82b $\pm$ 14.92
	0.5	76.61c $\pm$ 9.43
	0.7	29.41d $\pm$ 8.24
Peels	0.1	406.87b $\pm$ 4.48
	0.3	429.53a $\pm$ 2.01
	0.5	427.98a $\pm$ 0.60
	0.7	384.75c $\pm$ 4.36

Each value is the mean of three independent determinations of the same extract ($\pm$ SD). Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5% level by to LSD.

Table 2. Free cyanide content from three methods of preparation of plant materials

Tissues	Methods of preparation of plant materials	Free cyanide content ($\mu\text{g HCN} / \text{g dry weight}$)
Young leaves	Grinding using liquid nitrogen	391.76a $\pm$ 5.83
	Grinding in test tubes using a plastic pesple	377.41b $\pm$ 3.46
	Cutting into fine pieces	390.11a $\pm$ 3.75
Peels	Grinding using liquid nitrogen	446.28a $\pm$ 5.21
	Grinding in test tubes using a plastic pesple	427.13b $\pm$ 1.13
	Cutting into fine pieces	418.70b $\pm$ 1.52

Each value is the mean of three independent determinations of the same extract ($\pm$ SD). Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5% level by LSD.

3. การเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการสลายตัวของไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์

ผลการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการสลายตัวของไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์ โดยชั่งน้ำหนักของตัวอย่างจากใบอ่อนและเปลือกของหัวมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1 และ 0.3 ก. ตามลำดับ พบว่า การเตรียมตัวอย่างโดยการบดตัวอย่างใบอ่อนและเปลือกของมันสำปะหลังด้วยไนโตรเจนเหลวก่อนเติมลงในสารละลายที่ใช้สกัดนั้น ปริมาณไซยาไนด์ที่วัดได้มีค่าสูงสุดคือ 391.76 และ 446.28 ไมโครกรัม/ก. ไซยาไนด์ในน้ำหนักร้อย (Table 2) การบดด้วยไนโตรเจนเหลวนั้นทำลายผนังเซลล์ให้แตกได้มากกว่าการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีอื่นๆ ทำให้เอนไซม์ลินามาเรสซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์มีโอกาสเข้าทำการย่อยสลายสาร ไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์ได้สูง นอกจากนี้ความเย็นจากไนโตรเจนเหลวยังช่วยรักษาสภาพของเอนไซม์ในขณะการบดตัวอย่างด้วย จึงสามารถวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระได้มากที่สุด อย่างไรก็ตาม ยังพบอีกว่าปริมาณไซยาไนด์อิสระจากการเตรียมตัวอย่างใบอ่อนโดยใช้มีดหั่นละเอียดนั้นมีค่าเท่ากับ 390.11 ไมโครกรัม/ก. ไซยาไนด์ในน้ำหนักร้อย ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าปริมาณไซยาไนด์ที่ได้จากการบดตัวอย่างใบอ่อนด้วยไนโตรเจนเหลว ดังนั้น การใช้มีดหั่นใบอ่อนให้ละเอียดจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในกรณีที่ไม่มีไนโตรเจนเหลวหรือหาไนโตรเจนเหลวได้ยาก

สรุปผลการทดลอง

ไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์ในเนื้อเยื่อของมันสำปะหลังจะถูกเปลี่ยนเป็นไซยาไนด์ และสามารถวัดปริมาณของไซยาไนด์ได้ง่ายในรูปของไซยาไนด์อิสระ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสลายตัวของไซยาโนจีนิกกลูโคไซด์เป็นไซยาไนด์ในมันสำปะหลังพันธุ์หัวยวง 60 อายุ 12 เดือน อุณหภูมิ 50 °ซ และ pH 5.0 ที่เวลา 60 นาที สามารถวัดปริมาณของไซยาไนด์ในใบและเปลือกของหัวมันสำปะหลังได้สูงสุด ในขณะที่น้ำหนักของตัวอย่างใบและเปลือกของหัวมันสำปะหลังสามารถวัดปริมาณไซยาไนด์ได้สูงสุดคือ 0.1 และ 0.3 ก. ตามลำดับ นอกจากนี้การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวก่อนใส่ลงในสารที่ใช้สกัด สามารถวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระได้สูงสุด

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2541. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวเคมีและคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งในหัวมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับพันธุ์และอายุการเก็บเกี่ยว. หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลัง. 166 หน้า.
สุรินทร์ ตั้งมันคงวรกุล สุวิษ ศิริวัฒนโยธิน และ วีระ โลหะ. 2546. การสลายตัวของไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลังบดด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่เอง. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 26(4):475-486.

- Akiyama, H., T. Toida, S. Sakai, Y. Amakura, K. Kondo, Y. Sugita-Konnishi, and T. Maitani, 2006. Determination of cyanide and thiocyanate in Sugihiratake Mushroom using HPLC Method with fluorometric detection. *J. of Health Sci.* 52(1):73-77.
- Beynum, G.M, A. Van and J.A. Roels. 1985. *Starch conversion technology*. New York, Marcel Dekker, 326 p.
- Cardoso, A. P., E. Mirione, M. Ernesto, F. Massaza, J. Cliff, M. R. Haque and J. H. Bradbury. 2005. Processing of cassava roots to remove cyanogens. *J. of Food Composition and Analysis* 18:451-460.
- Cooke, R. D., G. G. Blake and J. M. Battershill. 1978. Purification of cassava linamarase. *Phytochemistry* 17:381-388.
- Conn, E. 1979. Cyanogenic glycosides. *Int. Rev. Biochem.* 27:21-43.
- Esser, S. A. J. A. 1993. Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen. *J. Sci. Food Agri.* 63:287-296.
- Fokunang, C. N., P. T. Tonkins, A. G. O. Dixon, E. A. Tembe, B. Salwa, E. N. Nukenine and I. Horan. 2001. Cyanogenic potential in food crops and its implication in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) production. *Pakistan J. of Biol. Sci.* 4(7):926-930.
- Howlett, W. P., G. R. Brubaker, N. Mlingi and H. Rosting. 1990. Konzo, an epidemic upper motor neuro disease studied in Tanzania. *Brain* 113:223-235.
- Ikediodi, C. O., G. O. C. Onyia and C. E. Eluwah. 1980. A rapid and inexpensive enzymatic assay for total cyanide in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and cassava products. *Agric. Biol. Chem.* 44(12):2803-2809.
- Itoh-Nashida, T., M. Hirairra and Y. Uda. 1987. Purification and properties of β -D-glucosidase (linamarase) from the Butter Bran (*Phaseolus lunatus*). *J. of Biochem.* 101:847-854.
- McMahon, J. M., W. L. B. White and R. T. Sayre. 1995. Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. of Exp. Bot.* 46:731-741.
- Mkpong, O. F., H. Yan, G. Chisn and R. T. Sayre. 1990. Purification characterization and location of linamarase in cassava. *Pl. Physiol* 93:176-181.
- Mlingi, N., N. H. Poulter and H. Rosting. 1992. An outbreak of acute

- intoxications from consumption of insufficiently processed cassava in Tanzania. *Nutr. Res.* 12:677-687.
- Nambisan B. and S. Sundaresan. 1994. Distribution of linamarin and its metabolising enzymes in cassava tissue. *J. Sci Food Agric.* 66:563-567.
- O' Brien, G. M. 1991. Improved enzyme potential assay for cyanogens in fresh and processed cassava. *J. Sci Food Agric.* 56:277-289
- Padmaja, G. 1995. Cyanide detoxification in cassava for food and feed uses. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35:299-339.
- Seto, Y. 2002. False cyanide detection. *Anal. Chem.* 74:135A-141A.
- Uritani, I., V. V. Goria and E. M. T. Mendoza. 1994. Post harvest biotechnology of plant food material in the tropics. Japan Science Social Press, Tokyo. 47-56 pp.
- White, W. L. B., J. M. McMahon and R. T. Sayre. 1994. Regulation of cyanogenesis in cassava. *Acta Hort.* 375:69-78.
- Yeoh, H. H. 1989. Kinetic properties of β - glucosidase from cassava. *Phytochemistry* 28(3):721-724.