รายการอ้างอิง

ฉรงค์ นิยมวิทย์. 2538. องค์ประกอบและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของอาหาร. กรุงเทพมหานคร: ฟอร์แมทพริ้นติ้ง.

บุญธิดา โฆษิตทรัพย์. 2534. โปรตีนเข้มข้นจากใบผักตบชวา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บุญยืน สาริกะภูติ. 2522. โปรตีน. เชียงใหม่: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปริญญา สุวงศ์วาร. 2532. ยาสูบ ว่าด้วยทฤษฎีและการปฏิบัติ. กรุงเทพมหานคร: โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง.

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา. 2532. การหาปริมาณนิโคตินในใบยาสูบและบุหรี่ด้วยวิธี HPLC. กรุงเทพมหานคร: โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง.

มาตราฐานอุตสาหกรรม, สำนักงาน. 2513. มาตราฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำซอสปรุงรส. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : กระทรวงอุตสาหกรรม.

เยาวลักษณ์ สุรพันธ์พิศิษฎ์. (กุมภาพันธุ์ 2518). โปรตีนใบพืช. วารสารวิทยาศาสตร์การอาหาร. 7: 54-66.

วินิจ เฮงประเสริฐ. 2540. สรุปผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีใบยาสูบเวอร์ยิเนียและใบยาเบอร์เลย์อเมริกัน รุ่นปี 1990-1996. กรุงเทพมหานคร: โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง.

สุนทรี วรผลึก และ วิมลมาศ พวงนาค. 2527. ยาสูบที่ใช้ผลิตบุหรี่ซิกาแลต. กรุงเทพมหานคร: โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง.

อรรถ บุญนิธี. 2525. ประชากร. ใน ชีววิทยา, หน้า 852-890. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

Addy, T.C. and Kung, S.D. 1983. Soluble proteins in tobacco and their potential use. In L. Telek and H.D. Graham (eds.), Leaf Protein Concentrates, pp. 490-507. Westport: AVI

Association of Official Analytical Chemists. 1995. Official Methods of Analysis. 15th ed. Washington D.C.: Association of official Analytical Chemists.

Arkcoll, D.B. 1973. The preservation and storage of leaf protein preparations. J. Sci. Food Agri. 24: 437-445.

Arkcoll, D.B. and Festenstein, G.N. 1971. A preliminary study of the agronomic factors affecting the yield of extractable leaf protein. J. Sci. Food Agri. 22: 49-56.

Betschart, A.A. 1974. Nitrogen solubility of alfalfa protein concentrate as influenced by various factors. J. Food Sci. 39: 1110-1115.

Betschart, A.A. and Kinsella, J.E. 1973. Extractability and solubility of leaf protein. J. Agri. Food Chem. 21: 60-65.

Bray, W.J. and Humphries, C. 1978. Solvent fractionation of leaf juice to prepare green and white protein products. J. Sci. Food Agri. 29: 839-846.

Byers, M. 1983. Extracted leaf proteins: the leaves of some plants growing in Ghana. J. Sci. Food Agri. 12: 20-30.

Cochran, W.G. and Cox, G.M. 1957. Experimental Designs. NewYork: John Willey & Sons.

De Jong, D.W. 1991. Tobacco leaf protein: I. An evaluation of the use of putative chemical growth enhancers for tobacco leaf protein production. Beitrage zur Tabakforschung Interational. 15: 33-41.

De Jong, D.W. and Saunders, J.A. 1986. Fluctuations in protein levels of tobacco leaves and consequences for extractability. Beitrage zur Tabakforschung Interational. 13: 139-149.

Ellis, R.J. 1978. Chloroplast proteins and their synthesis. In G. Norton. (ed.), Plant Proteins, pp. 25-40. London: Butterworths.

Fahn, A. 1989. Plant Anatomy. Oxford: Pergamon Press.

Fennema, O.R. 1996. Food Chemistry. NewYork: Marcel Dekker.

Hall, G.M. 1996. Methods of Testing Protein Functionality. NewYork: Blackie Academic and Professional.

Hood, L.L. and Brunner, J.R. 1975. Compositional and solubility characteristics of alfalfa protein fractions. J. Food Sci. 40: 1152-1155.

Ivey, F.S., Webb, N.B. and Jones, V.A. 1970. The effect of disperse phase droplet size and interfacial film thickness on the emulsifying capacity and stablity of meat emulsions. Food Technol. 24: 1279-1281.

Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of proteins in foods: a survey. Crit,. Rev. Food Sci. Nutr. 7: 219-280.

Knuckles, B.E. and Kohler, O.G. 1982. Functional properties of edible protein concentrates from alfalfa. J. Agri. Food Chem. 30: 748-752.

Knuckles, B.E. and Kohler, O.G., and de Fremery, D. 1979. Processing of fresh tobacco leaves for protein fractions. J. Agri. Food Chem. 27: 414-418.

Kohler, G.O. and Bickoff, E.M. 1971. In N.W. Pirie. (ed.), Leaf Protein: Its Agromomy, Preparation, Quality and Use, pp. 69-77. Oxford: Blackwell.

Kohler, G.O. and Knuckles, B.E. 1977. Edible protein from leaves. Food Technol. 31: 191-195.

Kohler, G.O. and Lyon, C.K. 1977. Plant protein sources. In J.R. Whitaker and S.R. Tannenbaum, (eds.), Food Proteins, pp. 516-541. Wesport: AVI.

Kung, S.D. and et al. 1980. Tobacco as a potential food source and smoke material: Nutritional evaluation of tobacco leaf protein. J. Food Sci. 45: 320-327.

Kung, S.D. and Tso, T.C. 1978. Tobacco as a potential food source and smoke material: Soluble protein content, extraction and amino acid composition. J. Food Sci. 43: 1844-1852.

Lawhon, J.T. and Cater, C.M. 1971. Effect of processing method and pH of precipitation on the yields and functional properties of protein isolates from glandless cottonseed. J. Food Sci. 36: 372-377.

Lawhon, J.T., Cater, C.M. and Mattil, K.F. 1972. A whippable extract from glandless cottonseed flour. J. Food Sci. 37: 317-321.

Lehninger, A.L. 1977. Biochemistry. 2nd ed. NewYork: Worth.

Lin, M.J.Y. and Humbert, E.S. 1974. Certain functional properties of sunflower meal products. J. Food Sci. 39: 368-370.

Lu, P.S. and Kinsella, J.E. 1972. Extractability and properties of protein from alfalfa leaf meal. J. Food Sci. 37: 94-99.

Mattil, K.F. 1971. The functional requirements of protiens for foods. J. Am. Oil Chem. Soc. 48: 447-480.

Nagy, S., Telek, L., Hall, N.T. and Berry, R.E. 1978. Potential food uses for protein from tropical and subtropical plant leaves. J. Agri. Food Chem. 26: 1016-1028.

Nissin, O. 1986. MSTAT [computer program]. Michigan State University: Department of Crop and Soil Science.

Oke, O.L. 1973. Leaf protein research in Nigeria: A review. Trop. Sci. 15: 139-155.

Ostrowski, H.T. 1979. Seasonal variations in protein fractions, yields and quality of leaf protein concentrates extracted from pasture herbage. J. Food Proc. Pres. 3: 225-239.

Ostrowski, H.T. 1983. Optimization of the protein extraction process from grasslands in temperate and subtropical regions . In L. Telek and H.D. Graham, (eds.), Leaf Protein Concentrates. pp. 526-600. Westport: AVI.

Pirie, N.W. 1971. Leaf Protein: its agronomy, preparation, quality and use. Oxford: Blackwell.

Pirie, N.W. 1975. Leaf protein: a beneficiary of tribulation. Nature. 253: 239-241.

Pomeranz,Y. 1991. Functional Properties of Food Components. San Diego: Academic Press.

Provansal, M., Cug, J.L. and Cheftel, C. 1975. Chemical and nutritional modifications of sunflower proteins due to alkaline processing formation of amino acids crosslinks and isomerization of lysine residues. J. Agr. Food Chem. 23: 938-943.

Schwass, D.E. and Finley, J.W. 1984. Heat and alkaline damage to proteins: Racemization and Lysinoalanine formation. J. Agri. Food Chem. 32: 1377-1382.

Sheen. S.J. 1989. Thermal modification of the structural and functional properties of fraction-1-protein. J. Agri. Food Chem. 37: 605-610.

Sheen, S.J. 1991. Comparison of chemical and functional properties of soluble leaf proteins from four plant species. J. Agri. Food Chem. 39: 681-685.

Sheen, S.J. and Sheen, V.T. 1988. Effect of chemical and enzymatic degradation on the functional properties of fraction-1-protein. J. Agri. Food Chem. 36: 445-450.

Telek, L. and Graham, H.D. 1983. Leaf Protein Concentrates. Westport: AVI.

Tso, T.C. and Kung, S.D. 1983. soluble proteins in tobacco and their potential use. In L. Telek and H.D. Graham. (eds.), Leaf Protein Concentrates. pp. 117-132. Westport: AVI

Vinconneau, H.F. 1979. Processing of leaf proteins into food ingredients. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 469-471.

Wang, J.C. and Kinsella, J.E. 1975. Composition of alfalfa leaf protein isolates. J. Food Sci. 40: 1156-1161.

Wang, J.C. and Kinsella, J.E. 1976a. Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf protein. J. Food Sci. 41: 286-292.

Wang, J.C. and Kinsella, J.E. 1976b. Functional properties of alfalfa leaf protein: foaming. J. Food Sci. 41: 498-501.

Wildman, S.G. 1979. Tobacco a potential food crop. Crops and soils magazine. 1: 7-9.

Wildman, S.G. 1982. Process for isolation of proteins from plant leaves. U.S. Patent No. 4,347,324

Woodard, J., Short, D.D., Alvarez, M.R. and Reyniers, J. 1975. Biologic effects of N, ε-(DL-2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine, lysinoalanine. In M. Friedman (ed.). Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Part 2. NewYork: Marcel.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

ก. 1 **การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น**

ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC , 1995 - 950.46

อุปกรณ์

ตู้อบลมร้อนของ WTE Binder รุ่น E 53

วิธีทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2-5 กรัมใส่ในภาชนะอลูมิเนียมซึ่งแห้งสนิท
2. นำตัวอย่างไปอบในตู้อบโดยควบคุมอุณหภูมิ 110 ± 3 $^{\circ}$C 2 ชั่วโมง
3. นำออกจากตู้อบใส่ desiccator ทิ้งให้เย็น
4. ชั่งน้ำหนัก
5. นำไปอบต่ออีก 15-30 นาที จนน้ำหนักคงที่
6. คำนวณความชื้น

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนอบ (กรัม) - น้ำหนักหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)}} \times 100$$

ก. 2 **ปริมาณโปรตีน**

ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC , 1995 - 978.04

อุปกรณ์

Gerhardt Kjeldatherm Digestion Unit และ Gerhardt Vapodest

สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้น
2. สารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้น 0.1 N.
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50 %

4. สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4 %

5. คะตะลิสต์ (ส่วนผสมของโปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 10 กรัม + คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 . 5H_2O$) 0.5 กรัม ผสมกัน)

6. อินดิเคเตอร์ (สารละลายเมทธิลเรดและสารละลายโบโมครีซอลกรีนในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในอัตราส่วน 1: 5)

วิธีทดลอง

1. ชั่งน้ำหนักที่ทราบแน่นอนประมาณ 2 กรัม กรณีเป็นของเหลวใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

2. ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วใส่ antibumping beads ลงไป 2-3 เม็ด

3. เติมคะตะลิสต์ 1 กรัม (โปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 10 กรัม + คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 . 5H_2O$) 0.5 กรัม ผสมกัน) และกรดซัลฟุริกเข้มข้น 4 มิลลิลิตร

4. นำไปย่อยด้วยเครื่อง Kjeldatherm ซึ่งควบคุมอุณหภูมิในการย่อยเป็น

ช่วงที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 250 °C เป็นเวลา 15-20 นาที

ช่วงที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 380 °C เป็นเวลา 30-45 นาที

ช่วงที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 380 °C เป็นเวลา 20-30 นาที เพิ่มจากช่วงที่ 2 การเพิ่มอุณหภูมิในการย่อยต้องค่อยๆเพิ่ม ย่อยตัวอย่างจนใส เป็นสีฟ้าอ่อนหรือไม่มีสี

5. ทิ้งให้เย็น แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ต่อ Kjeldahl flask เข้ากับเครื่อง Vapodest

6. รอรับสารที่กลั่นด้วยสารละลายกรดบอริกที่มีความเข้มข้น 4 % ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งเติมเมทธิลโบรโมครีซอลกรีนอินดิเคเตอร์ (สารละลายเมทธิลเรดและสารละลายโบรโมครีซอลกรีนในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในอัตราส่วน 1: 5) 3-4 หยด

7. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดกลั่น กลั่นจนในขวดรองรับมีสารละลายปริมาตร 250 มิลลิลิตร

8. หยุดกลั่นนำสารละลายในขวดรองรับมาไตเตรทด้วยสารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้น 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีแดง

9. คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและปริมาณโปรตีน

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{\text{ปริมาณกรดซัลฟุริกที่ไตเตรท (ml)} \times \text{ความเข้มข้นกรดซัลฟุริก} \times 14}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)} \times 10}$$

ปริมาณโปรตีน(ร้อยละ) = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด x 6.25

ก. 3 **ไขมัน**

ตามวิธีของ AOAC , 1995 -930.09

อุปกรณ์

Soxhlet

วิธีทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบ 2 กรัม แล้วห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1
2. ใส่ใน Thimble สกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์
3. ใช้เครื่องมือวิเคราะห์ไขมันใช้เวลาสกัด 6-8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาระเหยปิโตรเลียม-อีเธอร์ออก
4. นำน้ำมันที่ได้ไปอบที่ 100 $^{\circ}$C 30 นาที
5. ทิ้งให้เย็นใน desiccator
6. ชั่งน้ำหนักคำนวณหาปริมาณไขมัน

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำมันที่สกัดได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

ก. 4 **เส้นใย**

ตามวิธีของ AOAC , 1995 - 962.09

สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้น 1.25 %
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.25 %

วิธีทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 2 กรัม (ทราบน้ำหนักแน่นอน) ใส่บีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 1.25 % ที่ต้มเดือดปริมาณ 200 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์
3. ย่อยตัวอย่างเป็นเวลา 30 นาที โดยให้สารละลายเดือดตลอดเวลา
4. กรองผ่านกระดาษ Whatman No. 41
5. ล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดฤทธิกรด
6. นำมาย่อยต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.25 % ที่ต้มเดือดปริมาตร 200 มิลลิลิตร

7. กรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอนและล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดฤทธิ์ด่าง

8. อบที่ 130 ± 2 °C 2 ชั่วโมง

9. ทิ้งให้เย็นใน desiccator

10. ชั่งน้ำหนัก

11. นำตัวอย่างพร้อมกระดาษกรองใส่ใน crucible แล้วเผาที่อุณหภูมิ 600 ± 15 °C 2 ชั่วโมง

12. ทิ้งให้เย็นใน desiccator

13. ชั่งน้ำหนักคำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{ปริมาณเส้นใย (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม) - น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ก. 5 <u>เถ้า</u>

ตามวิธีของ AOAC , 1995 - 930.05

<u>อุปกรณ์</u>

Muffle Furnace Carbolite รุ่น Mel 11-2

<u>วิธีทดลอง</u>

1. ชั่งตัวอย่างทราบน้ำหนักแน่นอน 2 กรัม ใส่ในครูซิเบิลที่เผาทราบน้ำหนักแน่นอน

2. นำตัวอย่างไปเผาจนหมดควัน

3. นำไปเผาต่อใน muffle furnace ที่ 600 °C 2 ชั่วโมง จนได้เถ้าสีขาว

4. ทิ้งให้เย็นใน desiccator

5. ชั่งน้ำหนักคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักหลังเผา (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ก. 6 <u>ปริมาณนิโคตินโดยใช้เครื่อง HPLC</u>

ตามวิธีของ Rothmans International Tobacco (UK) Limited, 1989 อ้างถึงใน ฝ่ายวิจัยและพัฒนา (2532)

สารเคมี

1. สารมาตรฐานนิโคติน purity 98 %
2. methanol HPLC grade
3. น้ำกลั่น HPLC grade
4. Phosphoric acid 0.2 %
5. Triethylamine

อุปกรณ์

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography
2. เครื่องเขย่าสาร
3. กระดาษกรองชนิด 0.45 Micron Cellulose Nitrate Membrane
4. คอลัมน์ Spherisorb C18 ODS (5 μm) ขนาด 25 cm. & 4.6 mm.
5. ชุดป้องกันคอลัมน์ Spherisorb C18 ODS (5 μm) ขนาด 25 cm. & 4.6 mm.
6. เครื่องชั่งชนิดละเอียด
7. บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร.

วิธีทดลอง

1. เตรียมความพร้อมเครื่อง HPLC โดยการปรับ conditions สำหรับหานิโคตินในใบยาด้วย Reverse Phase HPLC ดังนี้

คอลัมน์	:	Spherisorb C_{18} ODS ขนาด 25 ซ.ม. x 4.6 ม.ม. x 5.0 ไมครอน
Mobile Phase	:	Methanol - Buffer 65 : 35
Buffer	:	0.2 % Orthophosphoric acid ปรับ pH 7.25 ด้วย triethylamine
Detector	:	UV ที่ 254 นาโนเมตร
Ingection volumn	:	20 ไมโครลิตร
Flow rate	:	1.0 มิลลิลิตร./นาที.
Retention time	:	nicotine 6.30 ถึง 7.00 นาที

2. นำสารมาตรฐานนิโคตินมาเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานนิโคติน (Standard Nicotine Solution) โดยใช้ Methanol HPLC grade เป็นตัวทำละลาย เตรียมสารมาตรฐานนิโคตินให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC จาก peak area ที่ได้ นำมาทำ standard curve โดย plot กราฟระหว่างค่า peak area ของนิโคตินกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนิโคติน

- เติม 6 N HCl ลงใน 5 มิลลิลิตร เติมก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดฝา
- Hydrolyse ตัวอย่างผ่าน 110 °C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง
- กรองตัวอย่างผ่านเมมเบรนขนาน 0.45 ไมครอน
- ดูดสารละลายตัวอย่างมา 10 ไมโครลิตร แล้ว dry ให้แห้งโดยใช้ speed vac
- ละลายในบัฟเฟอร์ 250 ไมโครลิตร
- run sample 50 ไมโครลิตร (load sample 75 ไมโครลิตร)
- Dilution Factor = 1 : 250

2.) Performic Oxidation

- ชั่งตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 2.5 mg
- เติม i.s. ลงไป 50 mg
- ใส่ performic acid (19:1 HCOOH : H_2O_2) 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง
- ตั้งทิ้งไว้ที่ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำ HCl hydrolysis
- กรองตัวอย่างแล้วปิเปตมา 10 ไมโครลิตร
- dry ตัวอย่างให้แห้งโดยใช้ speed vac
- ละลายในบัฟเฟอร์ 250 ไมโครลิตร
- run sample 50 ไมโครลิตร (load sample 75 ไมโครลิตร)
- Dilution Factor = 1 : 1250

วิธีการคิดค่ากรดอะมิโนเป็นหน่วย g AA / 100 g sample (% AA)

1. <u>HCl Hydrolysis</u>

% AA = MW x n x 25.5 / (%R x wt) or

% AA = MW x n x 25 (%R x V)

MW : มวลโมเลกุลของกรดอะมิโน

n : nmol/run

%R : Recovery

V : ปริมาตรของตัวอย่างเป็น ไมโครลิตร

2. <u>Performic Oxidation</u>

%AA = MW x n X 12.5 / (%R x Wt or V)

3. นำตัวอย่างหลังจากเขย่าด้วยน้ำ 1 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษ Whatman เพื่อขจัดผงโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบออกแล้วกรองอีกครั้งด้วยกระดาษ cellulose nitrate ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อขจัดฝุ่นละอองหรือชิ้นส่วนเล็กๆ ออกให้หมด จากนั้นฉีดเข้าเครื่อง HPLC นำค่า peak area ที่ได้มาอ่านค่าความเข้มข้นจาก standard curve แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณนิโคติน

4. คำนวณ

$$\text{Conc. of Nicotine (mg./ml.)} = \frac{\text{peak area sample x conc. of standard (mg./ml.)}}{\text{peak area standard}}$$

$$\text{นิโคตินในใบยา \% w/w} = \frac{\text{Conc. of Nicotine (mg./ml.) x 100}}{\text{weight of sample}} \times \frac{100}{(100 - \text{moisture content})}$$

ก. 7 <u>การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ</u>

ดัดแปลงจาก มอก 8-2513

เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเทรตความเข้มข้น 0.1 N ($AgNO_3$) 30 มิลลิลิตร กรดไนตริกความเข้มข้น 6 N (HNO_3) 5 มิลลิลิตร และเฟอริกอลัมอินดิเคเตอร์ (ferric alum indicator) 5 มิลลิลิตร ลงในโปรตีนเข้มข้น (1 : 19) 10 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตซิลเวอร์ไนเทรตที่เหลือด้วยสารละลายโปตัสเซียมไธโอไซอะเนตความเข้มข้น 0.1 (KCNS)

วิธีการคำนวณ ให้คำนวณน้ำหนักเป็นกรัมของ NaCl

$$x = 117.0\ (30N_1 - yN_2)$$

x คือจำนวนกรัมของโซเดียมคลอไรด์ในตัวอย่างโปรตีนเข้มข้น 1000 กรัม

y คือจำนวน มิลลิลิตร ของสารละลายโปตัสเซียมไธโอไซอะเนตที่ใช้ไทเทรต

N_1 คือนอร์มัลลิตีที่แท้จริงของสารละลายซิลเวอร์คลอไรด์ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับคลอไรด์

N_2 คือ นอร์มัลลิตีที่แท้จริงของสารละลายโปตัสเซียมไธโอไซอะเนตที่ใช้ในกรไทเทรต

ก. 8 <u>วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน</u>

1. <u>Hydrolyzate Sample</u>

1.) HCl Hydrolysis

- ชั่งตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 5 mg เติมลงใน screwcap tube
- เติม i.s. (25 μmol/ml AAD) 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง

วิเคราะห์สมบัติการใช้งาน (Functional Property)

นำโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมาบดด้วยโกร่ง แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช เก็บไว้ใน desiccator ตลอดการศึกษา

ก. 9 ความหนาแน่น (bulk density)

วิเคราะห์โดยวิธีของ Wang และ Kinsella (1976)

ใส่ตัวอย่างโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบลงในกระบอกตวงขนาด 25 มิลลิลิตร ทำให้ตัวอย่างแน่นโดยนำกระบอกตวงเคาะกับพื้นโต๊ะเบาๆ 10 ครั้งทุกๆ ความสูง 5 เซนติเมตร บันทึกปริมาตรและน้ำหนักของตัวอย่าง ทำซ้ำ 3 ครั้งและคำนวณดังนี้

$$\text{ความหนาแน่น (กรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

ก. 10 ความสามารถในการดูดซับน้ำ (water absorption)

วิเคราะห์โดยวิธีของ Lin และคณะ (1974)

เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ 1.0 กรัม (ทราบน้ำหนักแน่นอน 4ตำแหน่ง) ที่บรรจุอยู่ในหลอดเหวี่ยงแยก (centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร คนแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำมาเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3700 รอบต่อนาที นาน 25 นาที วัดปริมาตรของน้ำที่ไม่ถูกดูดซับ (free water) และน้ำที่ถูกดูดซับไปนำมาคำนวณดังนี้

$$\text{ความสามารถในการดูดซับน้ำ (มิลลิลิตร/กรัมโปรตีน)} = \frac{\text{ปริมาตรของน้ำที่ถูกดูดซับ}}{\text{น้ำหนักของโปรตีน}}$$

ก. 11 ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน (fat absorption)

วิเคราะห์โดยวิธีของ Lin และคณะ (1974)

เติมน้ำมัน (corn oil) 3 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ 0.5 กรัม (ทราบน้ำหนักแน่นอน 4 ตำแหน่ง) ที่บรรจุอยู่ในหลอดเหวี่ยงแยก (centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร คนแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำมาเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3700 รอบต่อนาที นาน 25 นาที วัดปริมาตรของน้ำมันที่ไม่ถูกดูดซับ (free oil) และน้ำมันที่ถูกดูดซับไปนำมาคำนวณดังนี้

$$\text{ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน (มิลลิลิตร/กรัมโปรตีน)} = \frac{\text{ปริมาตรของน้ำมันที่ถูกดูดซับ}}{\text{น้ำหนักของโปรตีน}}$$

ก. 12 ความสามารถในการละลาย (solubility property)

วิเคราะห์โดยวิธีของ Wang และ Kinsella (1976)

ใช้ตัวอย่างโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ 0.05 กรัม (ทราบน้ำหนักแน่นอน) ละลายในน้ำกลั่นหรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 และ1.0 N ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับ pH 2 - 11 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที (วัดและปรับค่า pH ให้คงที่ทุก 15 นาที) แล้วนำมาเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x G (9500 rpm) นาน 10 นาที หาปริมาณไนโตรเจนในส่วนใสด้วยวิธี micro-Kjeldahl (AOAC, 1995) ค่าความสามารถในการละลายจะคำนวณในรูปเปอร์เซนต์ของไนโตรเจนที่ละลายได้ ดังนี้

$$\% \text{ ไนโตรเจนที่ละลายได้} = \frac{\text{ไนโตรเจนในส่วนใส x 100}}{\text{ไนโตรเจนในโปรตีน 0.05 กรัม}}$$

ก. 13 การเกิดอิมัลชัน (emulsion property)

วิเคราะห์โดยวิธีของ Wang และ Kinsella (1976)

emulsifying activity (EA) ชั่งตัวอย่างโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ 3.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปั่นในโถปั่นขนาดเล็กที่ความเร็วต่ำนาน 1 นาที เติมน้ำมัน (corn oil) 50 มิลลิลิตร แล้วปั่นอีกครั้งด้วยความเร็วสูงนาน 1 นาที เทส่วนผสมที่ได้ลงในหลอดเหวี่ยงแยกขนาด 12 มิลลิลิตร หลอดละ 10 มิลลิลิตรนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 3200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที คำนวณดังนี้

$$EA = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชั่น x 100}}{\text{ความสูงของสารทั้งหมด}}$$

emulsion stability (ES) วิธีวิเคราะห์ใช้วิธีเดียวกับ emulsifying activity โดยหลังจากนำส่วนผสมเทลงในหลอดเหวี่ยงแล้วนำไปให้ความร้อน 80 °C ใน water bath นาน 30 นาที นำมาให้ความเย็นที่อุณหภูมิ 15 °C นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 3200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที คำนวณดังนี้

$$ES = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชั่นหลังให้ความร้อน x 100}}{\text{ความสูงของสารทั้งหมด}}$$

ก. 14 ความสามารถในการเกิดฟอง (foaming property)

วิเคราะห์โดยวิธีของ Knuckles และ Kohler (1982)

foaming activity เตรียมสารละลายโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ 6 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เทใส่บีกเกอร์พลาสติกขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH แล้วกวนด้วยเครื่อง magnetic stirrer นาน 30 นาที ตีด้วยเครื่องผสม (AiRLUX® Super hand mixer model No. HA-3127) ด้วยความเร็วสูงสุด นาน 6 นาที เทของเหลวทั้งหมดลงในการบอกตวงขนาด 250 มิลลิลิตร วัดปริมาตรที่ได้ คำนวณดังนี้

$$\text{foaming activity} = \frac{\text{ปริมาตรฟองหลังการตี - ปริมาตรของเหลวเริ่มต้น}}{\text{ปริมาตรของเหลวเริ่มต้น}} \times 100$$

foam stability วิธีวิเคราะห์เช่นเดียวกับ foaming activity โดยรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาตรฟองที่เหลือต่อปริมาตรเริ่มต้น เมื่อเวลาผ่านไป 15 30 60 และ90 นาที

ภาคผนวก ข

การเพาะปลูกต้นยาสูบ

ที่มา ดร.ปริญญา สุวงศ์วาร ฝ่ายใบยา โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง

การเพาะปลูกยาสูบเวอร์ยิเนียเพื่อแผนพัฒนาคุณภาพใบยาก่อนการรับซื้อ

<u>การทำแปลงเพาะกล้า</u>

1. เลือกพื้นที่ดินร่วน ระบายน้ำได้ดี อยู่ใกล้แหล่งน้ำ แหล่งปลูก ไม่เป็นที่ร่ม การทำแปลงเพาะในที่ซ้ำกันทุกปีอาจก่อให้เกิดโรคระบาดในกล้ายาสูบได้ ควรหมุนเวียนไม่ทำแปลงเพาะซ้ำที่เดิมอย่างน้อย 3ปี
2. ไถดินตากแดด ขึ้นแปลงขนาด 1x11 เมตร ใช้สารเคมีกำจัดโรค แมลง และวัชพืชในดิน
3. หว่านปุ๋ยสูตร 4-16-24+4Mgo+0.5B จำนวน 2 กก./แปลง และคาร์โบฟูราน 250-300 กรัม/แปลง แล้วพลิกดินกลบ
4. คัดเลือกเมล็ดยาสูบที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 90 % ขึ้นไป หว่านโดยใช้เมล็ด 1-1.5 กรัม/แปลง
5. ใช้วัสดุคลุมแปลงเพาะ รดน้ำวันละ 4 ครั้งในสัปดาห์แรก ลดการรดน้ำลงเหลือ 2-3 ครั้งในสัปดาห์ถัดมา พ่นยาป้องกันกำจัดโรคและแมลง
6. เมื่อต้นกล้าอายุ 3 สัปดาห์ ควรถอนต้นกล้าที่ขึ้นหนาแน่นออก ให้เหลือจำนวนกล้าในแปลงเพาะ 550-600 ต้น/ตารางเมตร
7. งดให้น้ำเมื่อต้นกล้าอายุ 4 สัปดาห์ เปิดวัสดุคลุมแปลงเพาะ อาจมีการรดน้ำบ้างเมื่อกล้ายาสูบแสดงอาการขาดน้ำในช่วงเช้าในฤดูฝนอาจใช้วิธีตัดใบทิ้งบ้างแต่ต้องไม่ให้ยอดขาด และต้องเก็บเศษใบทิ้งและพ่นยาป้องกันโรคทุกครั้ง
8. ต้นกล้ายาสูบที่เหมาะสมสำหรับการย้ายปลูกควรมีอายุประมาณ 45 วัน นับจากวันหว่าน การชำกล้าในกระทง

วัสดุที่ใช้ทำกระทง ควรเป็นวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น เช่น ถุงพลาสติก ใบกล้วย หรือวัสดุอื่นที่ทดแทนกันได้ นำมาม้วนเป็นทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-2.5 นิ้ว ใส่ดินชำกล้า วางเรียงบนพื้นซึ่งโรยแกลบหนาประมาณ 1 นิ้ว เพื่อมิให้รากหยั่งลึกถึงดิน ลดปัญหารากขาดเมื่อย้ายปลูก

ต้นกล้าที่เหมาะสำหรับชำในกระทง ควรมีอายุประมาณ 20-25 วัน จุ่มรากของต้นกล้าในน้ำแล้วแตะคาร์โบฟูราน ให้ยาติดรากเล็กน้อย แล้วจึงนำต้นกล้าลงชำในกระทง สร้างเพิงมุงด้วยวัสดุที่หาง่าย เช่น ทางมะพร้าว เพื่อพรางแสงแดด และลดการกระแทกของเม็ดฝน ประมาณ 1 อาทิตย์เมื่อต้นกล้าตั้งตัวได้แล้ว จึงรื้อออกให้กล้าชำได้รับแสงแดด ดูแลรักษาพ่นยา ป้องกันกำจัดโรคแมลงโดยสม่ำเสมอ เมื่อต้นกล้าอายุ 45 วัน หรือภายหลังที่ชำในกระทง 20-25 วัน จึงสามารถย้ายปลูกในไร่ได้

การชำกล้าในกระทงสามารถย้ายปลูกได้ง่าย ต้นกล้าตั้งตัวเร็ว ไม่ชะงักการเจริญเติบโต ต้นยาสูบในไร่มีความสม่ำเสมอ ลดอัตราการปลูกซ่อม สามารถเก็บรอเวลาหากจำเป็นต้องเลื่อนวันปลูกได้ระยะหนึ่ง

รุ่นปลูก

รุ่นปลูกที่เหมาะสมโดยทั่วไปอยู่ในระหว่างเดือน กันยายน-ตุลาคม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพพื้นที่ของแหล่งปลูก สภาพที่สูง เช่น เชิงเขา สามารถปลูกในช่วงเดือนกันยายน พื้นที่ราบริมแม่น้ำ น้ำท่วมไม่ถึง มีการระบายน้ำดี ปลูกในเดือนตุลาคม และสำหรับที่ราบต่ำ น้ำท่วมถึงควรปลูกช่วงเดือนพฤศจิกายน นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับจังหวะการเก็บเกี่ยวพืชอื่นในที่ปลูกยาสูบ

อย่างไรก็ตาม การพิจารณากำหนดวันปลูกที่ความเหมาะสม ขึ้นอยู่กับสภาพการณ์ของแต่ละพื้นที่

สภาพดิน

ควรเป็นดินร่วนปนทราย มีการระบายน้ำได้ดี มีความสมบูรณ์พอสมควร สามารถควบคุมปริมาณธาตุอาหารในแต่ละช่วงการเจริญเติบโตโดยการให้ปุ๋ย

การเตรียมไร่ปลูก

กำจัดวัชพืช ไถดะ ทิ้งตากแดดไว้ 10 วัน แล้วจึงไถพรวน ยกแปลงแบบแถวคู่ หลังแปลงกว้าง 180 ซม.สูง 8-12 นิ้ว

การย้ายปลูก

กำหนดระยะปลูกระหว่างแถว 120 ซม. ระหว่างต้น 60 ซม. ในพื้นที่ 1 ไร่ ปลูกยาสูบได้ประมาณ 2,200-2,500 ต้น ขุดหลุมปลูกลึกประมาณ 4-6 นิ้ว รดน้ำ ใส่ยากำจัดแมลงประเภทดูดซึม เช่น คาร์โบฟูราน วางต้นกล้าในหลุมให้รากแตะกับยา กลบดินครึ่งหลุม รดน้ำ แล้วจึงกลบด้วยดินแห้งให้เต็มหลุม

การให้ปุ๋ย ปุ๋ยหลัก 4-16-24+4MgO+0.5B อัตรา 100 กก./ไร่ แบ่งใส่ 2 ครั้ง

ครั้งแรก ใส่พร้อมปลูกสำหรับกล้าชำ หรือเมื่ออายุ 7 วันสำหรับกล้าถอนปลูก ใส่เป็นแนวข้างต้นด้านใน ห่างจากต้น 3-4 นิ้ว เป็นแนวยาวตลอดแปลง ในอัตรา 75 กก./ไร่

ครั้งที่สอง เมื่ออายุ 25-30 วัน ใส่เป็นแนวเหมือนครั้งแรก ให้ห่างจากต้นในระดับปลายใบ ในอัตรา 25 กก./ไร่ ใช้ปุ๋ยเสริม 27-0-0 อัตรา 12 กก./ไร่ หรือ 22-0-0 อัตรา 15 กก./ไร่ หรือ 15-0-0 อัตรา 20 กก./ไร่ เพื่อเร่งการเจริญเติบโต

ครั้งที่สาม เมื่ออายุ 40-45 วัน ใช้ปุ๋ยเสริมละลายน้ำรดรอบโคนต้นโดยใช้ปุ๋ย 1 กระป๋องนมข้นต่อน้ำ 20 ลิตร คนให้ปุ๋ยละลายเข้ากับน้ำ แล้วตักรดต้นยาสูบต้นละ 1 กระป๋องนม โดยใช้ปุ๋ยสูตร 0-0-50 อัตรา 20 กก./ไร่ หรือ 13-0-46 อัตรา 15 กก./ไร่

การพรวนดินและกำจัดวัชพืช

กระทำอย่างน้อย 3 ครั้งพร้อมกับการใส่ปุ๋ย การพรวนดินทุกครั้งต้องนำดินกลบโคนต้น

การให้น้ำ

ยาสูบที่มีอายุ 30 วันแรก ควรให้น้ำเพียงเล็กน้อยตามแนวที่ใส่ปุ๋ย เป็นการกระตุ้นให้เกิดการสร้างราก ภายหลังที่ใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 แล้ว จึงมีการให้น้ำอย่างเพียงพอ จนสิ้นสุดการเก็บเกี่ยว

การตอนยอดและกำจัดแขนง

ทำการตอนยอดเมื่ออายุ 50-60 วัน ในระยะที่ต้นยาสูบกำลังสร้างช่อดอกมีดอกบานแล้ว 1-2 ดอก จึงทำการตอนยอด หักยอดให้เหลือใบไว้ 18-22 ใบ ตามความสมบูรณ์ของต้นยาสูบ แล้วใช้สารกำจัดแขนงรด

การใช้ยาป้องกันกำจัดโรค-แมลง

ปฏิบัติโดยสม่ำเสมอทุก 7-10 วัน สำหรับยาฆ่าแมลงควรใช้ชนิดถูกตัวตายสลับกับชนิดดูดซึม

การเก็บใบยาสด

ในกรณีที่มีการปฏิบัติตามขั้นตอนและมีการดูแลรักษาในไร่โดยสม่ำเสมอ ในสภาวะแวดล้อม สภาพอากาศ และปริมาณน้ำฝนที่ปรกติ สามารถเก็บยาสูบได้ครั้งแรก เมื่อต้นยาสูบอายุ 65-80 วัน เก็บครั้งละ 2-3 ใบ เฉพาะใบที่แก่-สุก นำไปบ่มและสามารถเก็บครั้งต่อไปทุก ๆ 7 วัน โดยทั่วไปเก็บเกี่ยวประมาณ 7 ครั้ง จึงหมดต้น ซึ่งจะเป็นเวลาที่ต้นยาสูบมีอายุ 120-130 วัน

การบ่มใบยาเวอร์ยิเนีย

การบ่มแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ

1. ระยะทำสี มีวัตถุประสงค์เพื่อเร่งขบวนการทางชีวเคมีในใบยา ลดปริมาณคลอโรฟิล ใบยาเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง มีองค์ประกอบทางเคมีเหมาะสมเมื่อเปลี่ยนสภาพเป็นใบยาแห้ง ใช้อุณหภูมิ 32-43 C เป็นเวลาประมาณ 30-70 ชั่วโมง

2. ระยะตรึงสี มีวัตถุประสงค์ เพื่อหยุดขบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของใบยาส่วนใหญ่ ใช้อุณหภูมิ 45-55 C เป็นเวลาประมาณ 15-20 ชั่วโมง

3. ระยะทำใบแห้ง ใช้อุณหภูมิ 57-63 C เป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้นในใบยาออกไปจนเนื้อใบยาแห้งกรอบ

4. ระยะทำก้านแห้ง เป็นการไล่ความชื้นออกจากใบยาต่อจากระยะทำใบแห้งโดยการเพิ่มอุณหภูมิ จนถึง 65-75 C เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง จนก้านใบยาแห้งสนิท

การเพาะปลูกยาสูบเบอร์เลย์เพื่อแผนพัฒนาคุณภาพใบยาก่อนการรับซื้อ

การทำแปลงเพาะกล้า

1. เลือกพื้นที่ดินร่วน ระบายน้ำได้ดี อยู่ใกล้แหล่งน้ำ แหล่งปลูก ไม่เป็นที่ร่ม การทำแปลงเพาะในที่ซ้ำกันทุกปีอาจก่อให้เกิดโรคระบาดในกล้ายาสูบได้ควรหมุนเวียนไม่ทำแปลงเพาะซ้ำที่เดิมอย่างน้อย 3 ปี
2. ไถดินตากแดด ขึ้นแปลงขนาด 1x11 เมตร ใช้สารเคมีกำจัดโรค แมลง และวัชพืชในดิน
3. หว่านปุ๋ยสูตร 4-16-24+4Mgo+0.5B จำนวน 2 กก./แปลง และคาร์โบฟูราน 250-300 กรัม/แปลง แล้วพลิกดินกลบ
4. คัดเลือกเมล็ดยาสูบที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 90 % ขึ้นไป หว่านโดยใช้เมล็ด 1-1.5 กรัม/แปลง
5. ใช้วัสดุคลุมแปลงเพาะ รดน้ำวันละ 4 ครั้งในสัปดาห์แรก ลดการรดน้ำลงเหลือ 2-3 ครั้งในสัปดาห์ถัดมา พ่นยาป้องกันกำจัดโรคและแมลง
6. เมื่อต้นกล้าอายุ 3 สัปดาห์ ควรถอนต้นกล้าที่ขึ้นหนาแน่นออก ให้เหลือจำนวนกล้าในแปลงเพาะ 550-600 ต้น/ตารางเมตร
7. งดให้น้ำเมื่อต้นกล้าอายุ 4 สัปดาห์ เปิดวัสดุคลุมแปลงเพาะ อาจมีการรดน้ำบ้างเมื่อกล้ายาสูบแสดงอาการขาดน้ำในช่วงเช้า ในฤดูฝนอาจใช้วิธีตัดใบทิ้งบ้าง แต่ต้องไม่ให้ยอดขาด และต้องเก็บเศษใบทิ้ง และพ่นยาป้องกันโรคทุกครั้ง
8. ต้นกล้ายาสูบที่เหมาะสมสำหรับการย้ายปลูกควรมีอายุประมาณ 45 วัน นับจากวันหว่าน

การชำกล้าในกระทง

วัสดุที่ใช้ทำกระทง ควรเป็นวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น เช่น ถุงพลาสติก ใบกล้วย หรือวัสดุอื่นที่ทดแทนกันได้ นำมาม้วนเป็นทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-2.5 นิ้ว ใส่ดินชำกล้า วางเรียงบนพื้นซึ่งโรยแกลบหนาประมาณ 1 นิ้ว เพื่อมิให้รากหยั่งลึกถึงดิน ลดปัญหารากขาดเมื่อย้ายต้นกล้าที่เหมาะสำหรับชำในกระทง ควรมีอายุประมาณ 20-25 วัน จุ่มรากของต้นกล้าในน้ำแล้วแตะคาร์โบฟูราน ให้ยาติดรากเล็กน้อย แล้วจึงนำต้นกล้าลงชำในกระทง สร้างเพิงมุงด้วยวัสดุที่หาง่าย เช่น ทางมะพร้าว เพื่อพรางแสงแดด และกันเม็ดฝนกระแทก ประมาณ 1 อาทิตย์เมื่อต้นกล้าตั้งตัวได้แล้ว จึงรื้อออกให้กล้าชำได้รับแสงแดด ดูแลรักษาพ่นยา ป้องกันกำจัดโรคแมลงโดยสม่ำเสมอ เมื่อต้นกล้าอายุ 45 วัน หรือภายหลังที่ชำในกระทง 20-25 วัน จึงสามารถย้ายปลูกในไร่ได้

การชำกล้าในกระทงสามารถย้ายปลูกได้ง่าย ต้นกล้าตั้งตัวเร็ว ไม่ชะงักการเจริญเติบโต ต้นยาสูบในไร่มีความสม่ำเสมอ ลดอัตราการปลูกซ่อม สามารถเก็บรอเวลาหากจำเป็นต้องเลื่อนวันปลูกได้ ระยะหนึ่ง

การเลือกพื้นที่ปลูก

สภาพดินที่ให้ปลูกยาสูบเบอร์เลย์ โดยทั่วไปควรมีความอุดมสมบูรณ์สูง เป็นดินร่วน หรือร่วนปนทราย ระบายน้ำดี

การเตรียมไร่ปลูก

ไถคะกลบวัชพืช ทิ้งตากแดดไว้ 10 วันแล้วไถพรวน ขึ้นแปลงปลูกความกว้างหลังแปลง 150 ซม. ระยะร่องน้ำ 30 ซม.

การย้ายปลูก

กำหนดระยะปลูกระหว่างแถว 90 ซม. ระหว่างต้น 60 ซม.เป็นแถวคู่สลับฟันปลา สามารถปลูกต้นยาสูบได้ 2,600-3,000 ต้น/ไร่ ขุดหลุมปลูกลึก 4-6 นิ้ว ใส่ปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยคอก 40 กรัม/หลุม ใส่ยาฆ่าแมลงชนิดดูดซึม เช่น คาร์โบฟูราน หรือเทมมิด 10 จี รดน้ำ นำต้นกล้ายาสูบลงปลูก กลบดิน รดน้ำอีกครั้งก่อนใช้ดินแห้งกลบป้องกันการระเหยของน้ำ

การใส่ปุ๋ยรุ่นต้นฤดู (สค.-กย.)

ครั้งที่หนึ่ง ใส่ปุ๋ยพร้อมปลูกในการใช้กล้าชำ หรือ อายุ 7-10 วัน ในการใช้กล้าถอนปลูก โดยใช้ปุ๋ย 6-12-24+ 4MgO+0.5 B ใส่เป็นจุดหรือเป็นแนวข้างต้นด้านในของแปลง ห่างจากโคนต้น 3-4 นิ้ว จำนวน 50 กก./ไร่

ครั้งที่สอง เมื่ออายุ 21-25 วัน ใช้ปุ๋ยสูตร 6-12-24+4MgO+0.5 B จำนวน 20 กก./ไร่ และปุ๋ย 27-0-0 จำนวน 30 กก./ไร่ ใส่ข้างต้นด้านในแปลง บริเวณปลายใบ ใส่เป็นจุดหรือแนวข้างต้น

ครั้งที่สาม เมื่ออายุ 40-45 วัน ใช้ปุ๋ยสูตร 6-12-24+4MgO+0.5 B จำนวน 30 กก. และปุ๋ย 27-0-0 จำนวน 20 กก./ไร่ ใส่ข้างต้นด้านในของแปลง ใส่เป็นจุดหรือเป็นแนวกลางแปลงปลูก

การใส่ปุ๋ยรุ่นกลางฤดู (ตค.-พย.) และรุ่นปลายฤดู

ครั้งที่หนึ่ง ใส่ปุ๋ยพร้อมปลูกในการใช้กล้าชำ หรือ อายุ 7-10 วัน ในการใช้กล้าถอนปลูก โดยใช้ปุ๋ย 6-12-24+4MgO+0.5 B ใส่เป็นจุดหรือเป็นแนวข้างต้นด้านในของแปลง ห่างจากโคนต้น 3-4 นิ้ว 100 กก./ไร่

ครั้งที่สอง เมื่ออายุ 21-25 วัน ใช้ปุ๋ย 27-0-0 ใส่ข้าง ต้นด้านใน บริเวณปลายใบ ใส่เป็นจุดหรือแนวข้างต้น ในอัตรา 50 กก./ไร่

ครั้งที่สาม ในกรณีที่มีฝนตกหนักติดต่อกัน ต้นยาสูบแสดงอาการขาดปุ๋ยหรือสภาพของไร่ปลูกที่ไม่เจริญเติบโตเท่าที่ควร ใส่ปุ๋ยเมื่ออายุ 40-45 วัน ใช้ปุ๋ยเสริม 13-0-46 ละลายน้ำรดโคนต้น โดยใช้ปุ๋ยอัตรา 15 กก./ไร่ ใช้ปุ๋ย 1 กระป๋องนม ละลายน้ำ 20 ลิตร คนปุ๋ยให้ละลายแล้วตักรดต้นละ 1 กระป๋องนม

การให้น้ำพรวนดิน

ให้น้ำครั้งแรกเมื่อยาสูบเบอร์เลย์มีอายุ 20-25 วัน และครั้งต่อ ๆ ไป ประมาณ 10-15 วัน/ครั้ง ขึ้นอยู่กับสภาพฝน พื้นที่ปลูก การพรวนดินควรทำพร้อมกับการให้ปุ๋ย โกยดินกลบโคนต้นทุกครั้งที่ทำการพรวนดิน

การตอนยอดตอนแขนง

ตอนยอดเมื่อยาสูบเบอร์เลย์อายุ 55-60 วัน เมื่อยาสูบสร้างช่อดอกและมีดอกบาน 1-2 ดอก ให้เหลือใบไว้ 20-24 ใบ/ต้น ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของต้นยาสูบ แล้วจึงใช้สารกำจัดแขนงรดที่ยอดตามคำแนะนำการใช้

การป้องกันกำจัดโรคและแมลงในไร่ปลูก

กำหนดการพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรค-แมลงโดยสม่ำเสมอ ในกรณียาฆ่าแมลงควรใช้ชนิดดูดซึมสลับกับชนิดถูกตัวตาย

การเก็บเกี่ยวใบยาเบอร์เลย์

- วิธีทะยอยเก็บ (Priming) ทะยอยเก็บ 2-4 ใบ/ครั้ง เมื่อต้นยาสูบมีอายุได้ 60-75 วัน เลือกเก็บใบยาที่สุกหรือแก่พอที่จะเก็บบ่มได้โดยมีข้อสังเกตดังนี้

1. ใบยามีสีเขียวอมเหลือง
2. ปลายและขอบใบลู่ลง
3. ผิวใบสากย่น
4. ก้านมีสีขาว ก้านใบทำมุมกับลำต้นกว้างกว่าเดิม

ระยะเวลาการบ่มใบยาแต่ละหมู่ควรอยู่ในช่วงต่อไปนี้

ยาตีนล่าง	25-30	วัน
ยากลาง-บน	40-45	วัน
ยายอด	35-40	วัน

- วิธีตัดต้นบ่ม (Stalk Cutting) มีผลดีกล่าวคือ เป็นการลดช่วงเวลาที่ยาสูบยืนต้นในไร่ ลดค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา ใบยาแห้งสีสดใส สม่ำเสมอ ใบบาง คุณภาพดี คัดแยกใบยาตามกลุ่มได้ชัดเจนแน่นอน หลังจากได้เก็บใบยาล่าง 4-6 ใบแล้ว รอให้ใบยาที่เหลือส่วนล่างสุดเหลืองจัด ใบยายอดเป็นสีเขียวอ่อน หรือเมื่อยาสูบอายุ 95-110 วัน จึงทำการตัดต้นบ่มโดยวิธีนี้มีระยะเวลาการบ่ม 50-60 วัน

การบ่มใบยาเบอร์เลย์

รักษาอุณหภูมิในโรงบ่มอยู่ในช่วง 16-30 C ความชื้นสัมพัทธ์ 65-70 % ไม่เกิน 80 % ตลอดระยะเวลาบ่ม

ภาคผนวก ค

รูป ค.1 basket centrifuge (Heraeus , Varifuge F)

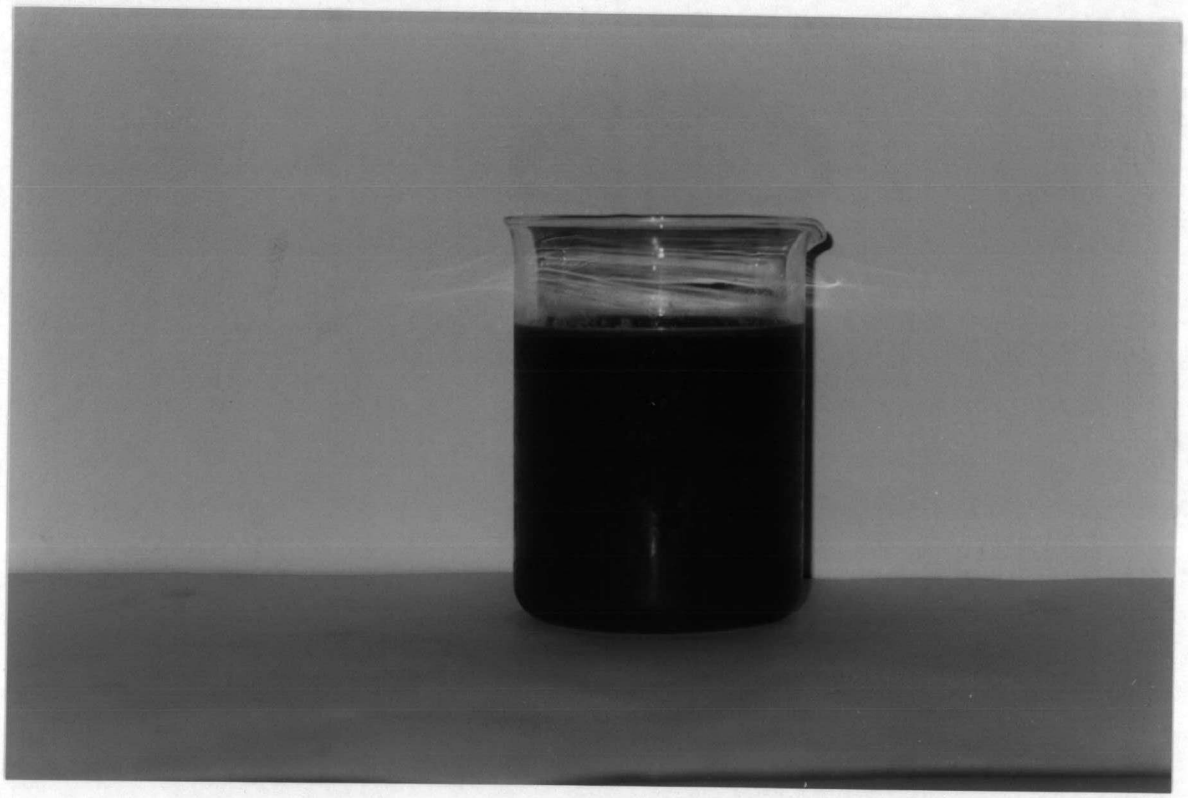
รูป ค.2 freeze dryer (Heto , FD3)

รูป ค.3 ต้นยาสูบพันธุ์เวอร์ยิเนีย (K326)

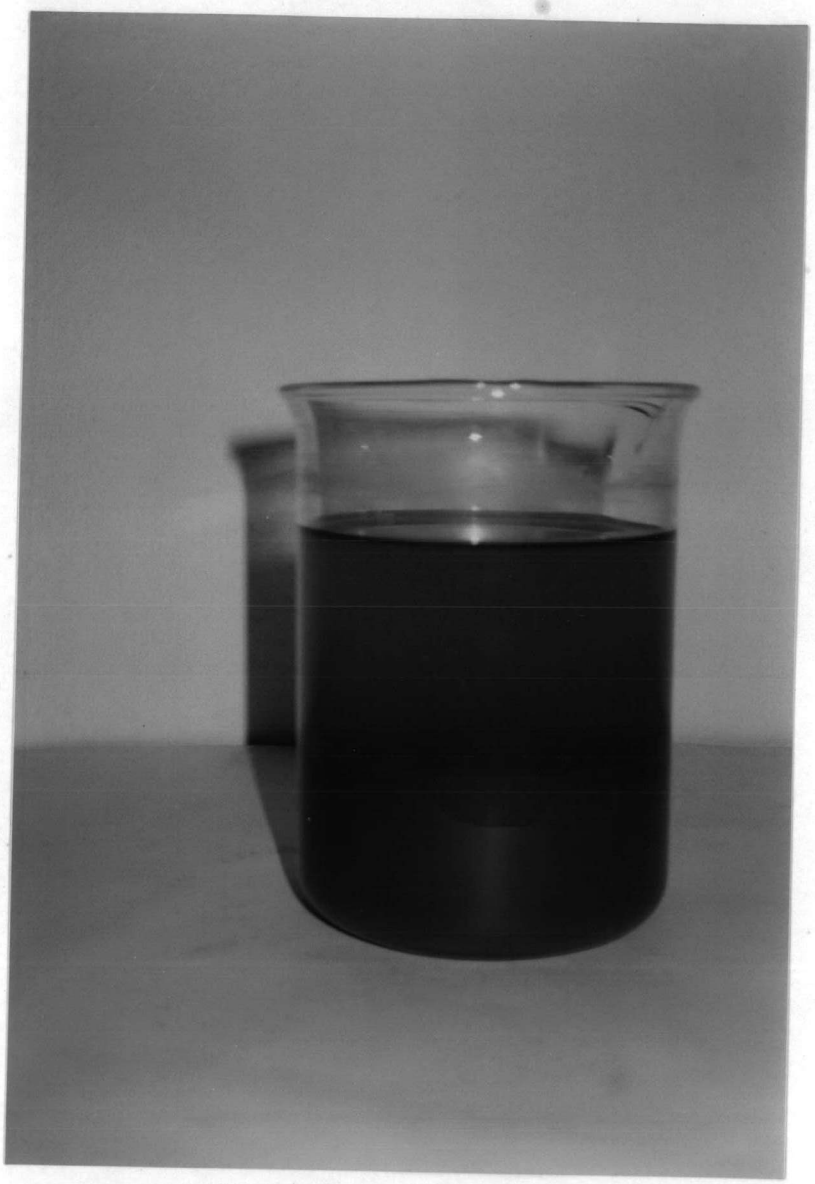
รูป ค.4 ต้นยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ (Ky14)

รูป ค.5 แปลงปลูกต้นยาสูบ

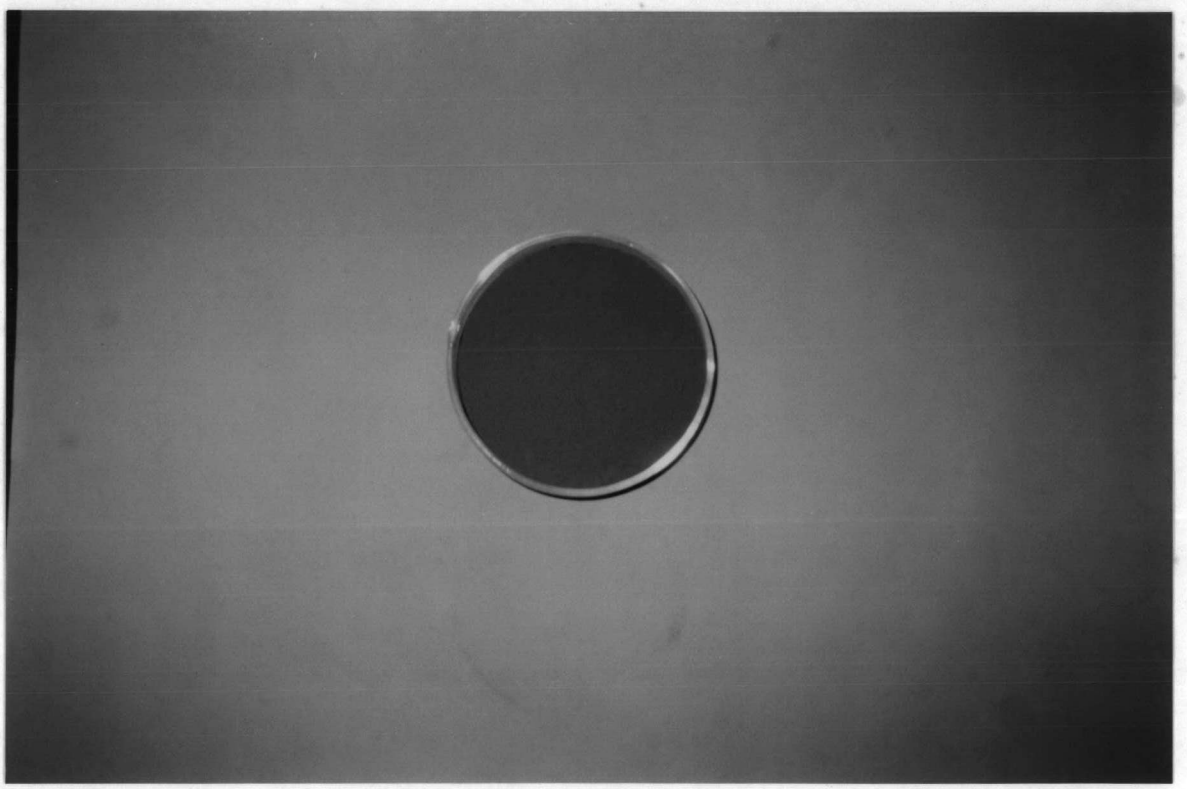
รูป ค.6 ใบยาสูบที่ใช้สกัดโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ (ปลูกในภาวะที่ใช้ปลูกทั่วไป)
พันธุ์เบอร์เลย์ อายุการเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 6 กก./ไร่
ระยะปลูก 60 x 90 ตารางเซนติเมตร
<u>สถานที่ปลูก</u> ต.ดงมะดะ กิ่งอำเภอแม่ลาว จ.เชียงราย



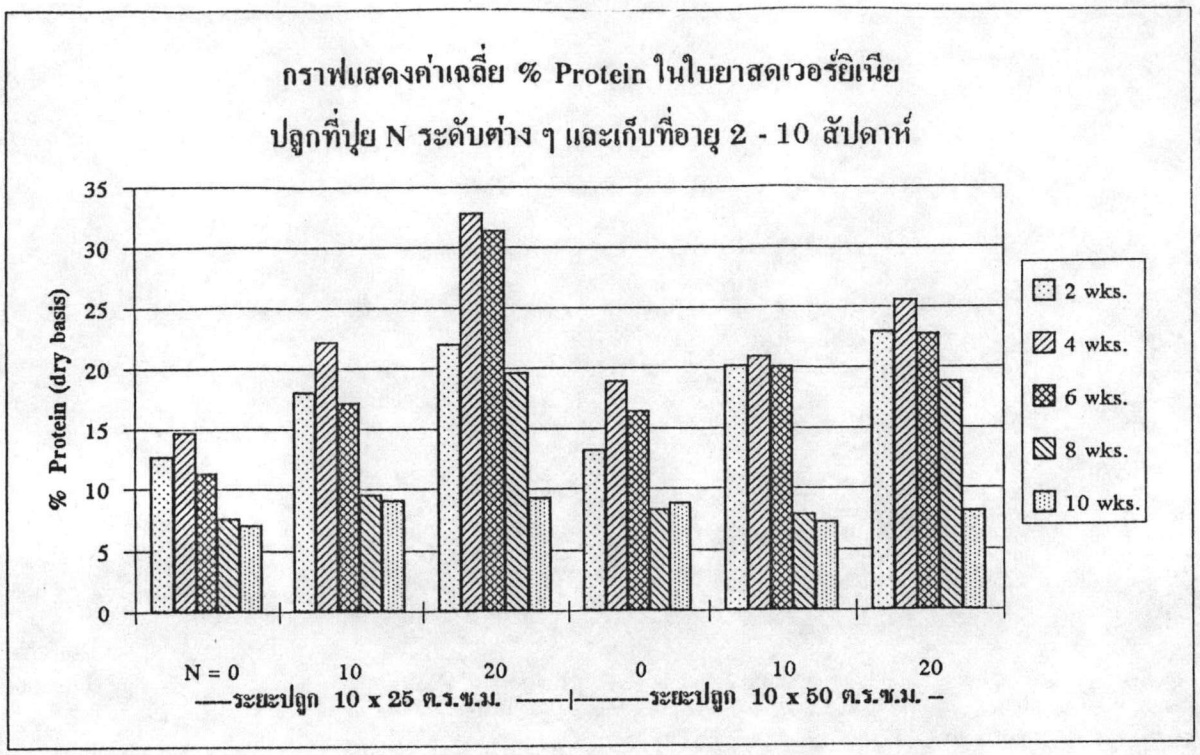
รูป ค.7 สารละลายใบยาสูบ (สกัดด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วนใบยาสูบต่อสารสกัด 1:8 pH 9)

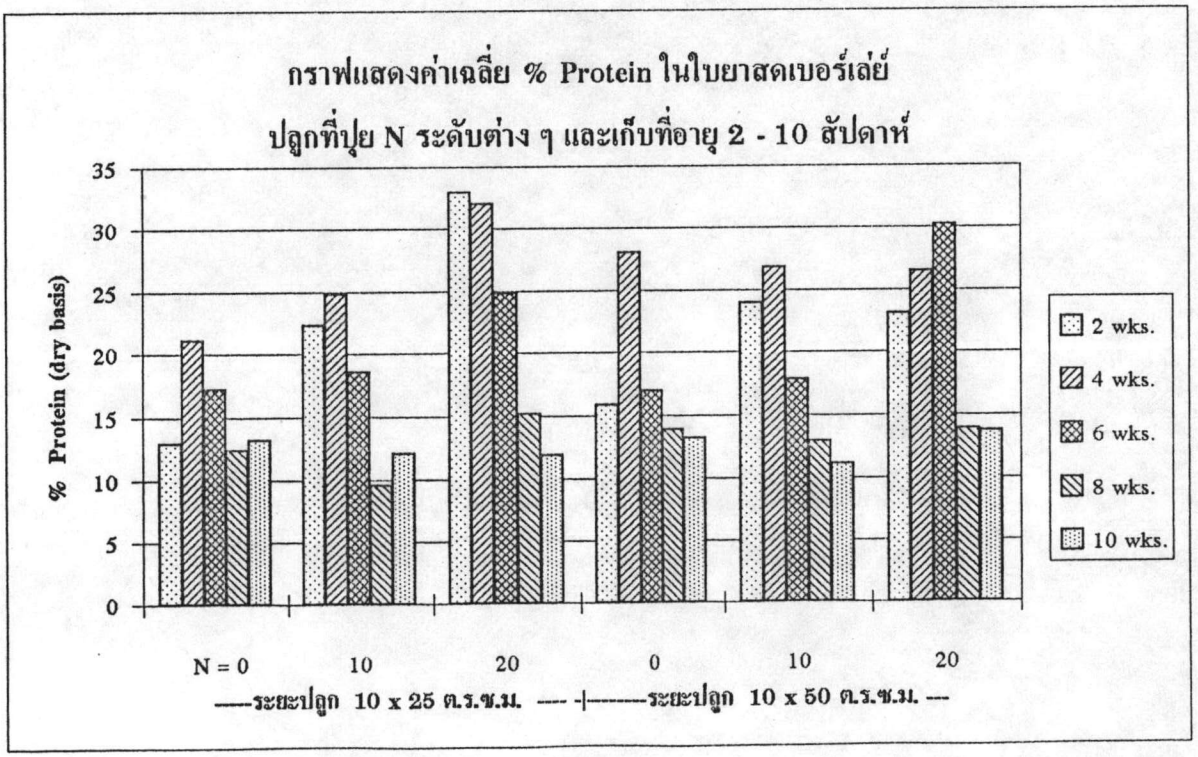


รูป ค.8 สารละลายโปรตีนจากใบยาสูบ

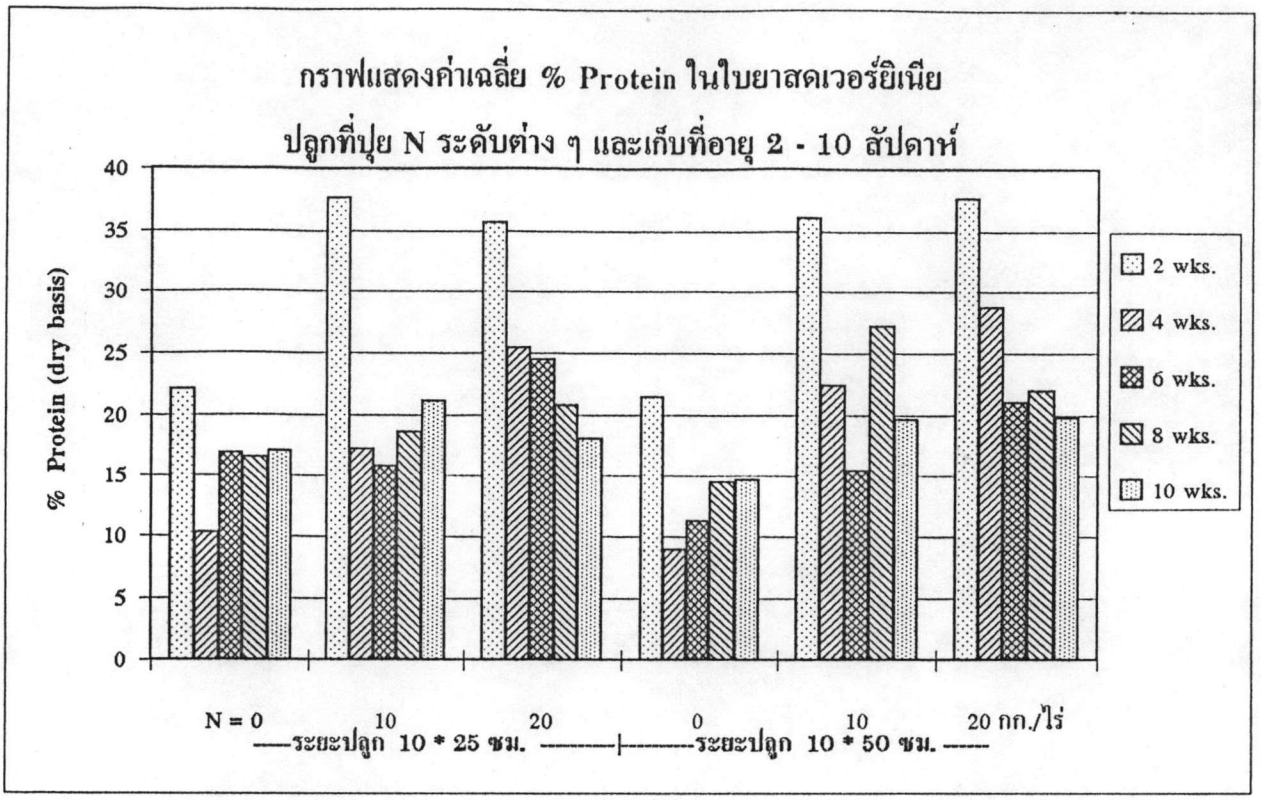


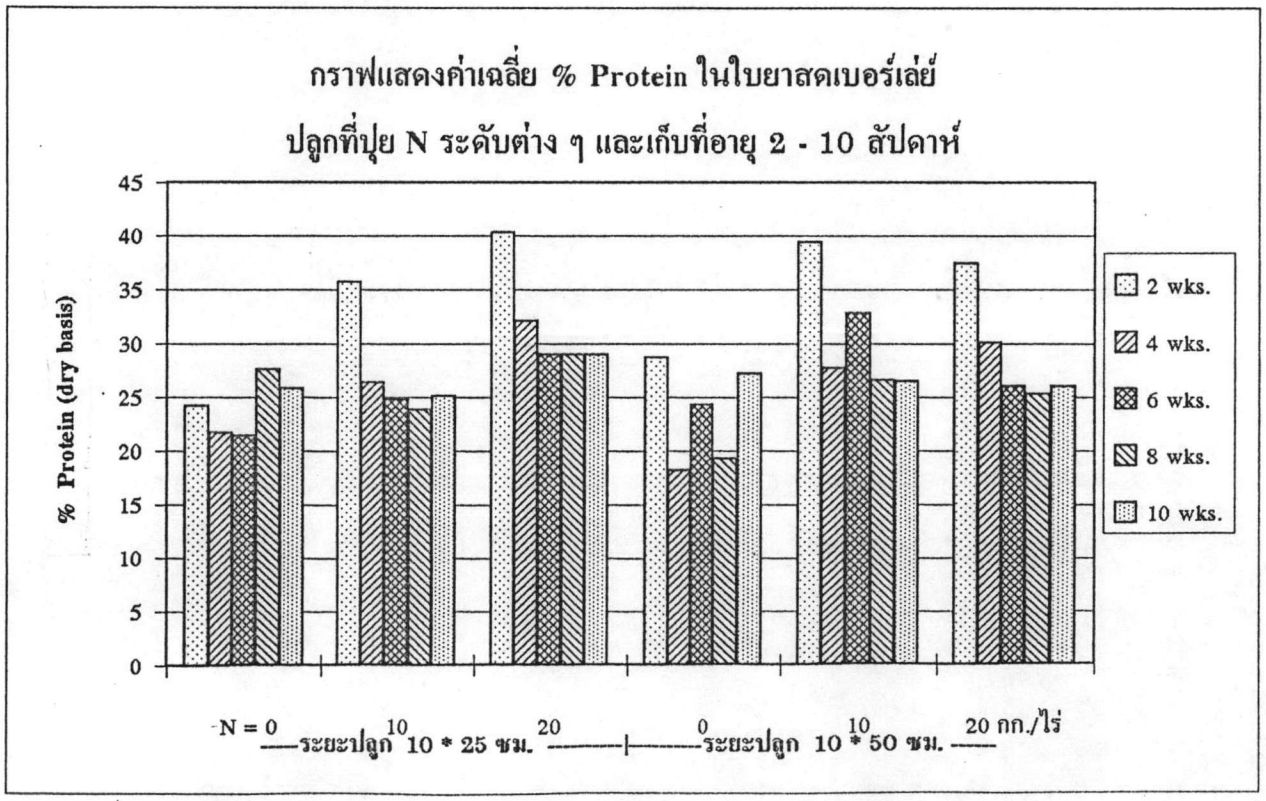
รูป ค.9 โปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ



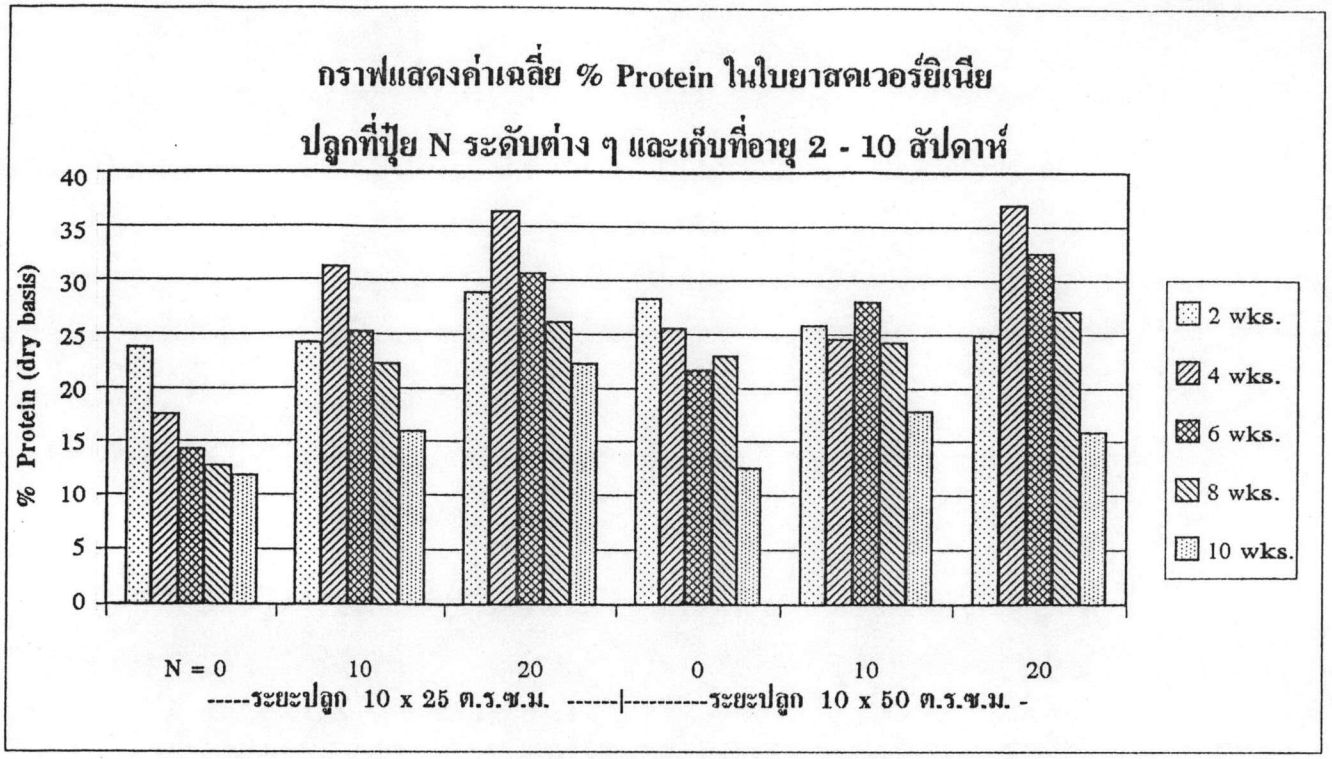


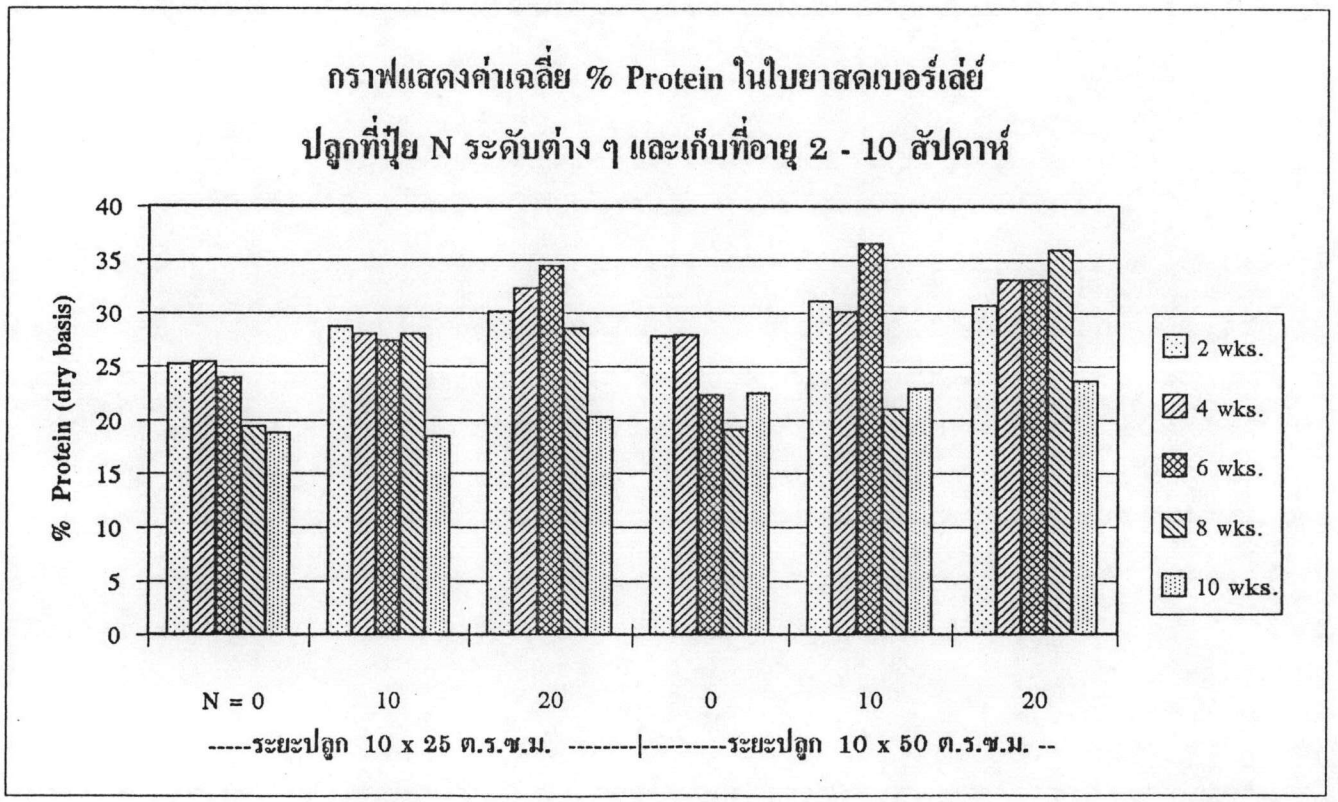
รูป ง.1 ปริมาณโปรตีนของใบยาสูบ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ที่ปลูกที่ภาวะต่างๆ ของการปลูกครั้งที่ 1 (ค่าเฉลี่ยจากแปลงปลูกทั้ง 3 แปลง)



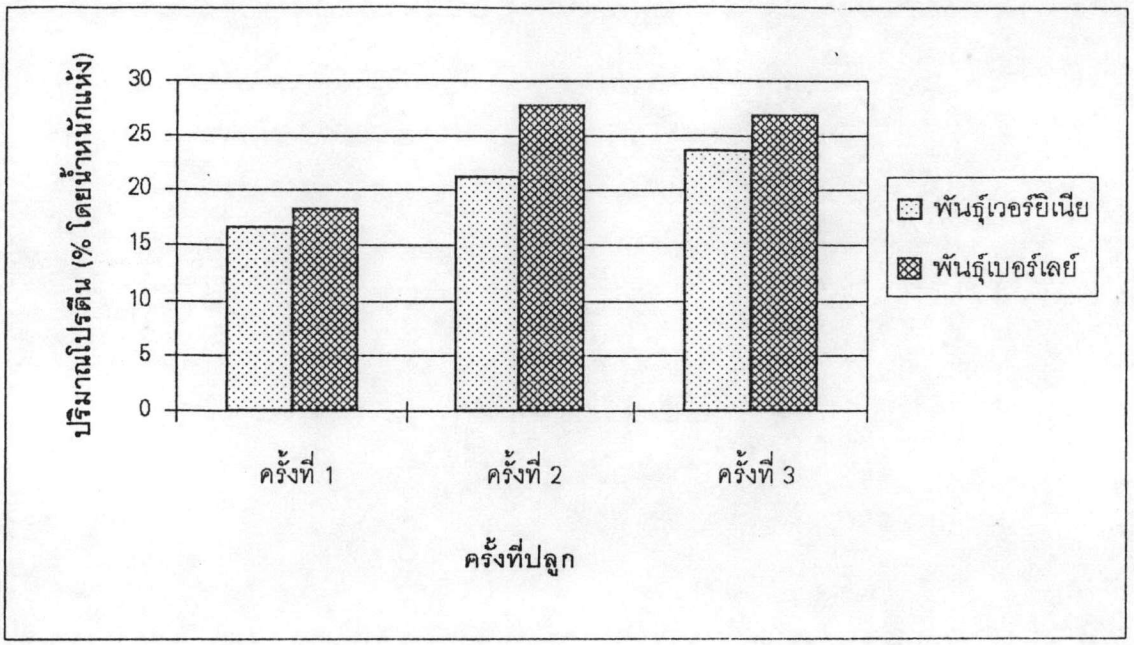


รูป ง.2 ปริมาณโปรตีนของใบยาสูบ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ที่ปลูกที่ภาวะต่างๆ ของการปลูกครั้งที่ 2 (ค่าเฉลี่ยจากแปลงปลูกทั้ง 3 แปลง)

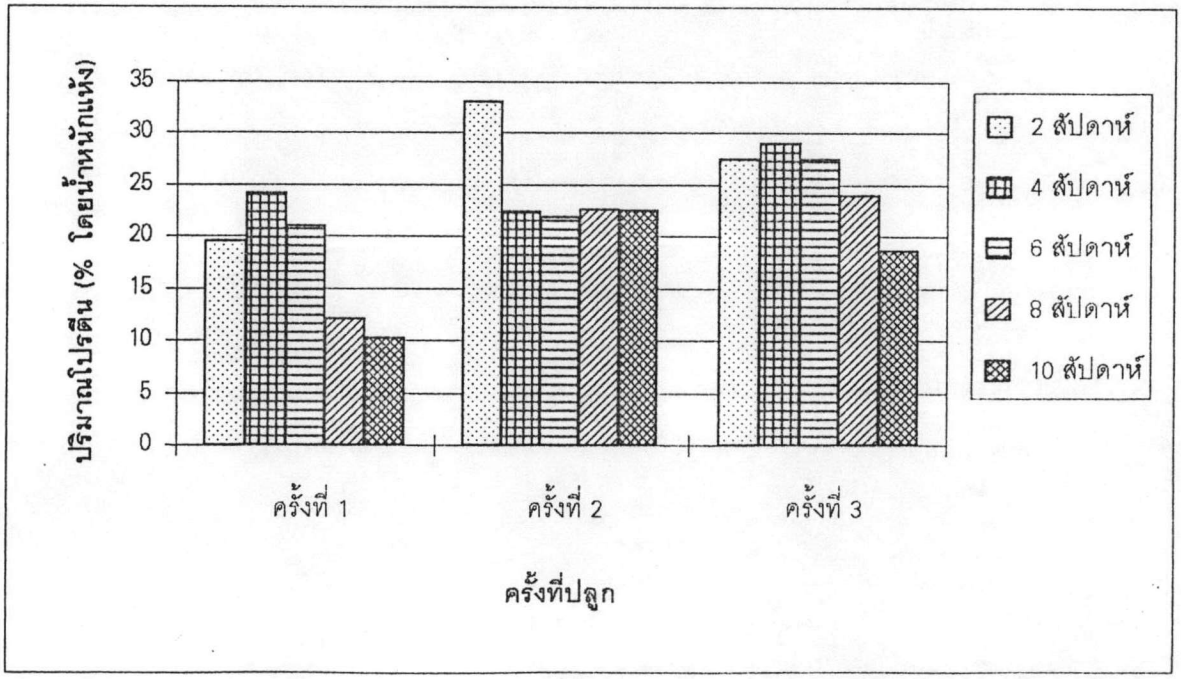




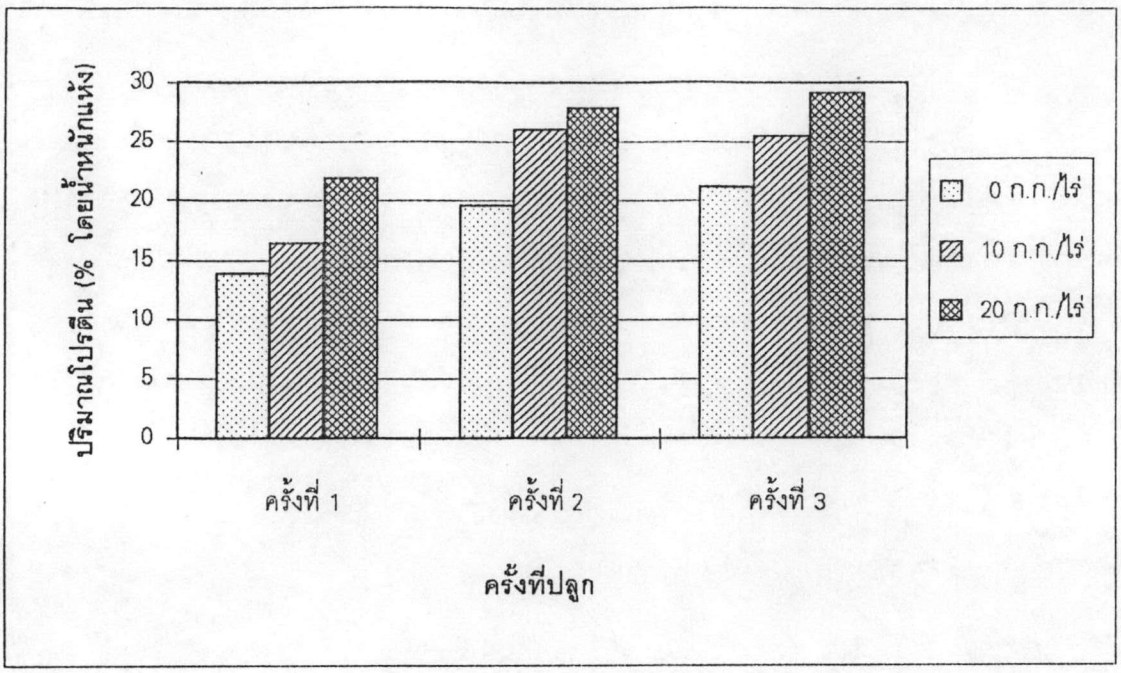
รูป ง.3 ปริมาณโปรตีนของใบยาสูบ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ที่ปลูกที่ภาวะต่างๆ ของการปลูกครั้งที่ 3 (ค่าเฉลี่ยจากแปลงปลูกทั้ง 3 แปลง)



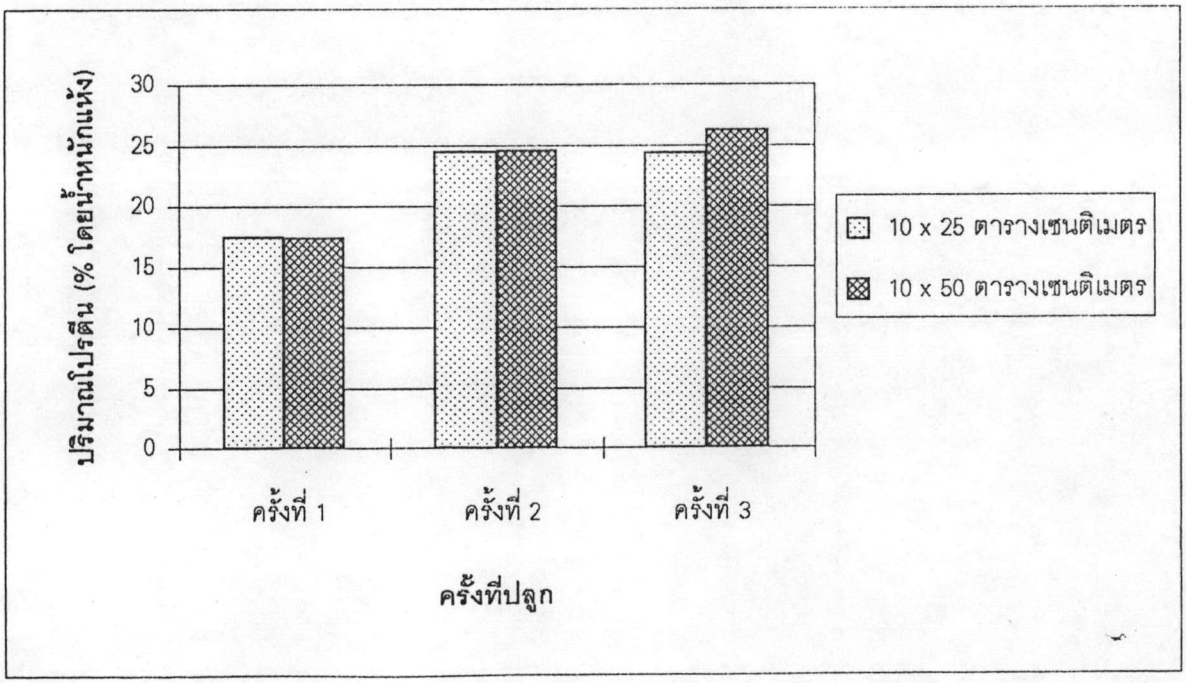
รูป ง.4 ปริมาณโปรตีนของใบยาสูบ (% โดยน้ำหนักแห้ง) จำแนกตามพันธุ์



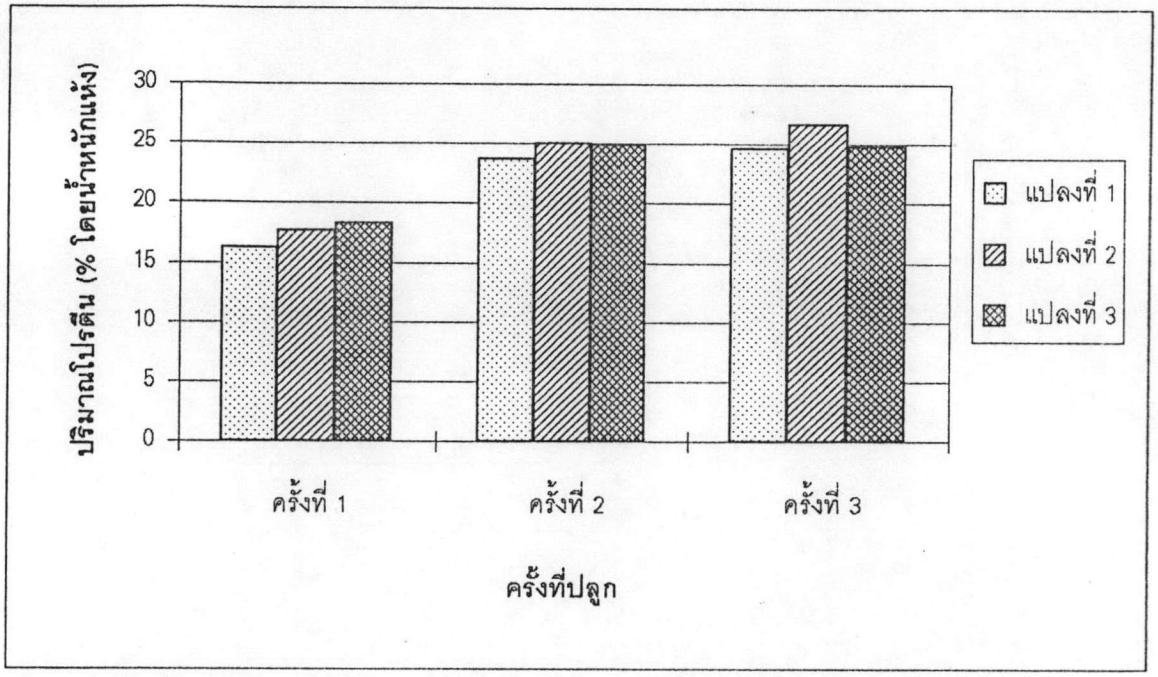
รูป ง.5 ปริมาณโปรตีนของใบยาสูบ (% โดยน้ำหนักแห้ง) จำแนกตามอายุการเก็บเกี่ยว



รูป ง.6 ปริมาณโปรตีนของใบยาสูบ (% โดยน้ำหนักแห้ง)
จำแนกตามปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน



รูป ง.7 ปริมาณโปรตีนของใบยาสูบ (% โดยน้ำหนักแห้ง) จำแนกตามระยะการปลูก



รูป ง.8 ปริมาณโปรตีนของใบยาสูบ (% โดยน้ำหนักแห้ง) จำแนกตามแปลงปลูก

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนิสานารถ กระแสร์ชล เกิดวันที่ 29 มิถุนายน พ.ศ. 2514 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อปีการศึกษา 2537 และในปีเดียวกันได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย