บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ความสนใจเกี่ยวกับโปรตีนเข้มข้นจากใบพืช (LPC) เริ่มมากว่า 60 ปีแล้ว โดยเฉพาะในช่วงสงครามโลกเกิดความขาดแคลนอาหาร นักวิทยาศาสตร์จึงหันมาสนใจโปรตีนจากพืชโดยเฉพาะใบพืชที่มีอยู่ตามธรรมชาติอย่างมากมาย ศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อความสามารถในการผลิตและปัจจัยที่สำคัญก็คือปริมาณโปรตีนในใบพืชต้องมีปริมาณสูง ควรเป็นพืชที่มีน้ำในเซลของใบมากและมีเส้นใยน้อยเพื่อง่ายต่อการสกัดโปรตีน (De Jong และ Saunders, 1986) ยาสูบเป็นพืชที่มีปริมาณโปรตีนในใบสูงประมาณ 40 % (โดยน้ำหนักแห้ง) มีน้ำในเซลมากและมีเส้นใยน้อยจึงมีความเหมาะสมที่จะนำใบยาสูบมาผลิตเป็นโปรตีนเข้มข้น ทั้งนี้ยาสูบเป็นพืชที่เป็นที่รู้จักกันดีว่านำมาผลิตเป็นบุหรี่ และซิการ์ซึ่งมักจะถูกมองว่าเป็นโทษต่อสุขภาพแต่เพียงอย่างเดียว ซึ่งความจริงแล้วยาสูบยังมีคุณค่าทางด้านอื่นๆ อีกหลายประการ ในแง่โภชนาการใบยาสูบยังมีกรดอะมิโนชนิดจำเป็น (essential amino acid) อยู่ในปริมาณสูง (Kung และ Tso, 1978; Kung และคณะ, 1980) ดังนั้นจึงสนใจที่จะนำใบยาสูบมาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต องค์ประกอบทางเคมี คุณค่าทางโภชนาการและสมบัติการใช้งานของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

5.1 ศึกษาพันธุ์และภาวะการปลูกต้นยาสูบที่เหมาะสมเพื่อใช้ผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ดิน แสง อุณหภูมิ ความชื้น มีผลอย่างมากต่อการเจริญเติบโต และกระบวนการชีววิทยาของต้นยา สภาพดินที่เหมาะสมมีความสำคัญเป็นอันดับแรก และปัจจัยสำคัญที่กำหนดลักษณะของดินที่เหมาะสำหรับปลูกยาสูบ คือ ธาตุอาหาร น้ำ และอากาศในดิน (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532) นอกจากนี้ยาสูบเป็นพืชที่มีการผลิตโปรตีนในปริมาณที่สูงกว่าพืชอีกหลายชนิด ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดโปรตีนที่สำคัญ คือ ชนิดและพันธุ์ของยาสูบ อายุการเก็บเกี่ยว ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน ระยะปลูก ฤดูการเพาะปลูก กรรมวิธีนี้ใช้ในการผลิต (เยาวลักษณ์ สุรพันธ์พิศิษฏ์, 2518) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปลูกยาสูบเพื่อใช้ผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

5.1.1 ศึกษาพันธุ์และภาวะการปลูกต้นยาสูบที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในใบยาสูบ

ในงานวิจัยนี้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปลูกยาสูบเพื่อผลิตเป็นโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ พันธุ์ 2 พันธุ์ คือ พันธุ์เวอร์ยิเนีย และพันธุ์เบอร์เลย์ อายุการเก็บเกี่ยว 2 4 6 8 และ 10 สัปดาห์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 0 10 และ 20 ก.ก./ไร่ และระยะปลูก 2 ระยะ คือ 10 x 25 และ 10 x 50 ตารางเซนติเมตร ปลูก 3 แปลง และปลูกทั้งหมด 3 ครั้ง เป็นการปลูกในฤดูกาล 2 ครั้ง นอกฤดูกาล 1 ครั้ง

ยาสูบปลูกได้ทั่วโลกแสดงว่ายาสูบปรับตัวได้ดีต่อสภาพดินและอากาศ ใบยาที่ผลิตได้แต่ละแห่งก็จะมีความแตกต่างกันไป จากทั้งปัจจัยที่เกี่ยวกับดิน ได้แก่ ปริมาณธาตุอาหาร ส่วนปัจจัยที่เกี่ยวกับอากาศ ได้แก่ ปริมาณและการกระจายของน้ำฝน อุณหภูมิ เป็นต้น ปัจจัยทั้งน้ำและอากาศนี้จะแตกต่างกันไปตามแต่ละบริเวณที่ปลูก ซึ่งจะส่งผลต่อภาวะที่เหมาะสมในการปลูกยาสูบด้วย ใบยาสูบในแต่ละแหล่งปลูกจึงแตกต่างกัน (สุนทรี วรผลึก และ วิมลมาศ พวงนาค, 2527)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยปัจจัยที่ศึกษา คือ พันธุ์ อายุการเก็บเกี่ยว ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนและระยะปลูก (ตารางที่ 4.1 4.2 และ 4.3) พบว่าปัจจัยที่ศึกษามีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณโปรตีนในใบยาสูบในแต่ละครั้งของการปลูก (crop) (รูปที่ 4.1 4.2 4.3 และ 4.4) และสามารถสรุปอิทธิพลของปัจจัยแต่ละชนิดที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในใบยาสูบในแต่ละครั้งของการปลูกดังรูปในภาคผนวก ง.

<u>การปลูกครั้งที่ 1 ในฤดูกาลเพาะปลูก (พ.ย. 39 - ม.ค. 41)</u> จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.1) มีปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในใบยาสูบ จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ 4.2) พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่าง อายุการเก็บเกี่ยวกับปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนและปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนกับระยะปลูกมีผลต่อปริมาณโปรตีน ($p \leq 0.05$) เมื่อวิเคราะห์จากปัจจัยร่วม (รูปที่ 4.1) พบว่า ภาวะการปลูกเมื่อเก็บเกี่ยวใบยาสูบที่อายุ 6 สัปดาห์ หลังจากย้ายกล้ามาปลูกลงในแปลงปลูกร่วมกับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน 20 ก.ก./ไร่ มีปริมาณโปรตีนในใบยาสูบสูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) กับการเก็บเกี่ยวใบยาสูบที่อายุ 4 สัปดาห์ ร่วมกับการใช้ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 20 ก.ก./ไร่ ดังนั้นจึงเลือกอายุการเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ ร่วมกับปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 20 ก.ก./ไร่ เนื่องจากใช้เวลาปลูกน้อยกว่า ใบยาสูบยังไม่มีเส้นใยมาก ทำให้ง่ายต่อการสกัดโปรตีนด้วย เนื่องจากในช่วง 2 สัปดาห์แรก หลังจากย้ายจากแปลงเพาะชำต้นยาสูบยังมีขนาดเล็กเป็นช่วงที่กำลังตั้งตัว มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเล็กน้อยต่อเมื่ออายุประมาณ 35-75 วัน เป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วอัตราการสร้างสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์สูงและรวดเร็ว(ปริญญา สุวงศ์วาร,

2532) ซึ่งจะอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 4-6 สัปดาห์พอดีสอดคล้องกับผลการทดลอง นั่นคือเมื่อพืชมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วกิจกรรมภายในเซลมีมากเมื่อมีปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนมากยาสูบก็จะยิ่งเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีอาหารอย่างเพียงพอ ประกอบกับเป็นช่วงปลายฤดูฝน ยังมีฝนตกชุกแต่ไม่ถึงกับท่วมแปลง ยิ่งทำให้พืชอวบน้ำอย่างยาสูบเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อฝนทิ้งช่วงพร้อมกับยาสูบใช้ปุ๋ยไปมากแล้วทำให้เหลือปุ๋ยไนโตรเจนน้อยจึงส่งผลให้หลังจากสัปดาห์ที่ 8 (วันที่ 61 หลังจากย้ายกล้า) จะพบว่ายาสูบจะมีปริมาณโปรตีนลดลง นั่นคือเริ่มเข้าสู่ช่วงขยายพันธุ์ (reproductive phase) มีการเคลื่อนย้ายสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์จากส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนจากใบไปสู่กระเปาะเมล็ดจึงทำให้โปรตีนในใบลดลง (Ellis, 1978)

ปี ค.ศ. 1971 Arkcoll และ Festenstein ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการสกัดโปรตีนของพืชหลายชนิด พบว่า ทั้งอายุการเก็บเกี่ยว และระยะการเติบโต มีผลต่อปริมาณโปรตีน โดยควรจะเก็บเกี่ยวใบพืชที่นำมาสกัดโปรตีนก่อนพืชจะเจริญเต็มที่ ซึ่งขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่างการสังเคราะห์และการเสื่อมสลายของโปรตีน การสังเคราะห์โปรตีนจะช้าลงในใบพืชที่มีอายุมาก และจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อถึงจุดสุกแก่ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนมีผลอย่างมากต่อ ปริมาณโปรตีน (Arkoll และ Festenstein , 1971; De Jong , 1991)

<u>การปลูกครั้งที่ 2 นอกฤดูกาลเพาะปลูก(ส.ค. 40 - ต.ค. 40)</u> จากการทดลอง (ตารางที่ 4.3) มีปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในใบยาสูบ จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ 4.4) พบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างอายุการเก็บเกี่ยวกับปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนมีผลต่อปริมาณโปรตีน ($p \leq 0.05$) และเมื่อวิเคราะห์จากปัจจัยร่วม (รูปที่ 4.3) พบว่า อายุการเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์ ที่ปริมาณปุ๋ย 20 ก.ก./ไร่ มีปริมาณโปรตีนในใบยาสูบสูงสุดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) กับอายุการเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์ที่ปริมาณปุ๋ย 10 ก.ก./ไร่ เนื่องจากเป็นการปลูกนอกฤดูเพาะปลูก คือจะปลูกในช่วงฤดูฝน เกิดน้ำท่วม ต้นยาสูบอาจเหี่ยวหรือตายได้เมื่อรากขาดออกซิเจน และจากการทดลองผู้ปลูกยาสูบในครั้งนี้ได้รายงานมาว่าเกิดฝนตกชุกในช่วงหลัง 2 สัปดาห์ ทำให้เกิดน้ำท่วม ต้นยาสูบชะงักการเจริญเติบโตทำให้มีปริมาณโปรตีนในช่วงอายุหลัง 2 สัปดาห์ ลดลงเมื่อเกิดน้ำท่วม น้ำชะเอาปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ในแต่ละแปลงรวมกัน ทำให้แปลงปลูกแต่ละแปลงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และจะพบว่าต้นยาสูบเจริญเติบโตใกล้เคียงกันทุกแปลงและทุกภาวะการปลูก นอกจากนี้ความชื้นในดินมีผลต่อคุณภาพใบยา Weybrew (1983) อ้างถึงในปริญญา สุวงศ์วาร (2532) กล่าวว่า ถ้าหากความชื้นในดินสูงจะได้ใบยาที่มีสารประกอบไนโตรเจนและนิโคตินต่ำ

<u>การปลูกครั้งที่ 3 ปลูกในฤดูกาลเพาะปลูก (พ.ย. 40 - ม.ค. 41)</u> จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.5) มีปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในใบยาสูบ จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ 4.6) พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนและระยะปลูกมีผลต่อปริมาณโปรตีน ($p \leq 0.05$) และเมื่อวิเคราะห์ปัจจัยร่วม (รูปที่ 4.4) พบว่า พันธุ์เบอร์เลย์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 20 ก.ก./ไร่ ที่ระยะปลูก 10 x 50 ตารางเซนติเมตร มีปริมาณโปรตีนในใบยาสูบมากที่สุดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) กับพันธุ์เบอร์เลย์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 20 ก.ก./ไร่ ระยะปลูก 10 x 25 ตารางเซนติเมตร พืชแต่ละชนิด แต่ละพันธุ์ มีองค์ประกอบและสมบัติแตกต่างกันไป การที่พันธุ์เบอร์เลย์มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าพันธุ์เวอร์ยิเนีย เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณโปรตีนในใบยาสูบสูง ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นสารนิโคตินในภายหลัง

ภาวะที่เหมาะสมในการปลูกยาสูบ คือ พันธุ์เบอร์เลย์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 20 ก.ก./ไร่ และระยะปลูก 10 x 25 ตารางเซนติเมตร ในครั้งนี้จะมีพันธุ์เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย เนื่องจากพันธุ์ยาสูบแต่ชนิดมีสมบัติแตกต่างกันไป โดยที่พันธุ์เบอร์เลย์เป็นยาสูบที่ในองค์ประกอบทางเคมีมีปริมาณนิโคตินสูง แต่ใบยาเวอร์ยิเนียจะมีนิโคตินระดับปานกลาง (วินิจ เฮงประเสริฐ, 2540) ความสามารถในการผลิตและสะสมนิโคตินนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์นั่นเอง ซึ่งนิโคตินนี้จะสร้างมาจากโปรตีนที่อยู่ในใบ สำหรับระยะปลูก 10 x 25 ตารางเซนติเมตรและเมื่อมีปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนมาก ต้นยาสูบสามารถดึงมาใช้ได้มากทำให้มีปริมาณโปรตีนมาก เนื่องจากใบยาสูบยังมีขนาดลำต้นเล็ก ดังนั้นพื้นที่ระหว่างต้นเพียงพอที่จะให้ใบยาสูบรับแสงแดดได้ทั่วถึง และที่ระยะปลูกนี้สามารถปลูกยาสูบได้เป็นจำนวนมาก ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ภาวะที่เหมาะสมในการปลูกยาสูบเพื่อผลิตเป็นโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบก็คือ พันธุ์เบอร์เลย์ อายุการเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 20 ก.ก./ไร่ และระยะปลูก 10 x 25 ตารางเซนติเมตร

ปริมาณโปรตีนในใบยาสูบจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณปุ๋ยที่ให้และปริมาณแสงแดดที่ได้รับ แต่ถ้าปลูกแบบหนาแน่น ใบยาสูบที่อยู่ข้างล่างได้รับแสงแดดไม่เพียงพอ ใบจะแก่เร็วขึ้นทำให้โปรตีนลดลงอย่างรวดเร็ว (Arkoll และ Festenstein , 1971) จากผลการทดลองพบว่า ที่ระยะปลูก 10 x 25 และ10 x 50 ตารางเซนติเมตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในการปลูกครั้งที่ 3 เท่านั้น แต่การปลูกครั้งที่ 1 และ 2 ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า ใบยาสูบได้รับแสงแดดอย่างทั่วถึงจึงทำให้ไม่มีความแตกต่างระหว่างระยะปลูกนัก

จากผลการทดลองและเมื่อพิจารณาค่าทางสถิติของการปลูกยาสูบทั้ง 3 ครั้งสามารถสรุปถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ ชนิดและพันธุ์ของพืช พืชแต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันแม้ในพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันจะมีปริมาณแตกต่างกันไปเช่นกัน (Arkcoll และ Festenstein, 1971; Wildman, 1982) ซึ่งในการทดลองนี้พบว่ายาสูบพันธุ์เวอร์ยิเนียและเบอร์เลย์มีปริมาณ

โปรตีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.1 4.2 และ 4.3) Wildman (1979) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและพบว่ายาสูบพันธุ์เบอร์เลย์มีศักยภาพในการนำมาผลิตเป็นโปรตีนเข้มข้น ปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งคือ อายุการเก็บเกี่ยวซึ่งพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันไปในแต่ละช่วงอายุ รวมทั้งระยะปลูก ใบยาสูบที่พัฒนาขึ้นเพื่อผลิตบุหรี่ไม่เหมาะที่จะนำมาสกัดโปรตีน เนื่องจากโปรตีนมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเจริญเต็มที่ (maturity) ยาสูบที่ปลูกอย่างหนาแน่นและเก็บเกี่ยวก่อนจะถึงช่วงเจริญเต็มที่จะให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด (De Jong และ Saunders, 1986) โปรตีนในใบยาสูบที่ปลูกอย่างหนาแน่นจะเริ่มลดลง 30 วัน ก่อนยาสูบจะออกดอก ซึ่งยาสูบที่ปลูกในประเทศไทยจะเริ่มออกดอกเมื่ออายุประมาณ 50-60 วัน (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532) ดังนั้นช่วงที่เหมาะสมที่จะนำใบยาสูบมาสกัดเพื่อผลิตเป็นโปรตีนเข้มจากใบยาสูบเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงสุด คือยาสูบอายุประมาณ 30 วัน หรือ 4 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง นอกจากนี้ยาสูบจะเริ่มสร้างนิโคตินจากรากขึ้นไปเก็บสะสมไว้ที่ใบเมื่ออายุมากกว่า 30 วัน หลังจากย้ายจากแปลงเพาะชำมาปลูก (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532) นอกจากนี้ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนที่สำคัญที่สุดก็คือ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนทั้งนี้ถึงแม้ว่ายังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าไนโตรเจนที่มีอยู่ในใบยาสูบทั้งหมดจะอยู่ในโมเลกุลโปรตีนซึ่งโดยทั่วไปไนโตรเจน 75 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในเซลพืชจะเป็นองค์ประกอบของโปรตีน (Kohler และ Bickoff, 1971) ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อให้ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนสูงถึง 20 ก.ก./ไร่ จะได้ปริมาณโปรตีนในใบยาสูบสูงที่สุดและมีแนวโน้มว่าจะสูงขึ้นมากกว่านี้ถ้าใช้ปริมาณปุ๋นไนโตรเจนมากกว่า 20 ก.ก./ไร่ อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงความคุ้มค่าและการเกิดสารประกอบ non-protein nitrogen หรือสารนิโคตินร่วมด้วย

จากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการปลูกทั้ง 3 ครั้ง สามารถสรุปภาวะที่ได้ในแต่ละครั้งดังนี้

ปลูกครั้งที่ 1 อายุเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ ร่วมกับปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 10 ก.ก./ไร่ และปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 20 ก.ก./ไร่ ร่วมกับระยะปลูก 10 x 25 ตารางเซนติเมตร

ปลูกครั้งที่ 2 อายุการเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์ ร่วมกับปริมาณปุ๋ย 10 ก.ก./ไร่

ปลูกครั้งที่ 3 พันธ์เบอร์เลย์ร่วมกับปริมาณปุ๋ย 20 ก.ก./ไร่ และระยะปลูก 10 x 25 ตารางเซนติเมตร

จากการปลูกทั้ง 3 ครั้ง จะพบว่า ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 3 มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน เนื่องจากปลูกในฤดูเพาะปลูกเดียวกันแต่ต่างปีกันซึ่งมีปัจจัยทางด้านปริมาณน้ำฝนและอากาศของแต่ละปีไม่เหมือนกันทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างกันบ้างแต่ก็มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน ส่วนการปลูกในครั้งที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงนอกฤดูการเพาะปลูก และเป็นช่วงปลายฤดูฝน เข้าสู่ฤดูหนาว

อากาศมีความแปรปรวนมาก และมีฝนตกชุกตั้งแต่ยาสูบมีอายุได้ประมาณ 2 สัปดาห์ เกิดน้ำท่วมขังแปลงปลูก ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนในใบยาสูบตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ถึง 10 (ตารางที่ 4.3, 4.4 และรูปที่ 4.3) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ไม่ว่าจะใช้ปริมาณปุ๋ยเท่าใดก็ตาม และเมื่อพิจารณาแปลงปลูกเอาครั้งที่ 2 นี้ ทั้ง 3 แปลง (block) (ตารางที่ 4.4) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เนื่องจากน้ำท่วมขังทำให้ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนในแต่ละแปลงปลูกนั้นกระจายไปทั่วบริเวณที่น้ำท่วมถึง (ทั้ง 3 แปลง) จึงไม่มีความแตกต่างกัน ทำให้พืชเจริญเติบโตใกล้เคียงกันจึงมีปริมาณโปรตีนในใบยาสูบที่ช่วงอายุ 4 ถึง 10 สัปดาห์นี้มีปริมาณใกล้เคียงกัน

สรุปภาวะที่เหมาะสมในการปลูกใบยาสูบ คือ

พันธุ์เบอร์เลย์ อายุการเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 20 ก.ก./ไร่ และปลูกที่ระยะปลูก 10 x 25 ตารางเซนติเมตร

5.1.2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบยาสูบ

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของใบยาสูบที่ปลูกตามภาวะที่เหมาะสมและภาวะที่ปลูกทั่วไปพบว่า ใบยาสูบที่ปลูกที่ภาวะที่เหมาะสมนั้น จะมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 37.30 % ไขมัน 3.63 เส้นใย 8.88 % เถ้า 23.41 % และนิโคติน 1.06 % โดยน้ำหนักแห้ง และที่ปลูกที่ภาวะปลูกโดยทั่วไปมี โปรตีน 31.21 % ไขมัน 6.13 % เส้นใย 8.17 % เถ้า 11.46 % และนิโคติน 0.74 % โดยน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้การที่ใบยาสูบที่ปลูกที่ภาวะนี้มีเถ้าปริมาณสูงเนื่องจากยาสูบต้องใช้แร่ธาตุต่าง ๆ ทั้งที่มีอยู่ในดินและเติมลงไปโดยเฉพาะโปแตสเซียมซึ่งเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของเถ้ามีความจำเป็นต่อระบบเอนไซม์ มีความสำคัญในการกำหนดคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของใบยาสูบ นอกจากนี้ยังมีแคลเซียมซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ในรูปของเกลือที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเถ้า นอกจากนี้ยังมี โบรอน คลอรีน กำมะถัน แมกนีเซียม แมงกานีส ซึ่งทำให้เถ้าของใบยาสูบมีปริมาณสูง โดยปกติใบยาเบอร์เลย์ที่แก่เต็มที่เพื่อใช้ผลิตบุหรี่หลังจากนำไปบ่มตามกรรมวิธีในการผลิตบุหรี่จะมีปริมาณนิโคตินสูงถึง 3-4 % ซึ่งปกติยาสูบจะเริ่มสร้างนิโคตินขึ้นที่รากแล้วนำไปเก็บสะสมไว้ที่ใบเมื่ออายุมากกว่า 30 วันหลังย้ายจากแปลงเพาะชำ (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532) ซึ่งในใบยาสูบที่ใช้ทดลองนี้อายุ 4 สัปดาห์มีนิโคติน 1.06 % แสดงว่าปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ลงไปมีผลในการเร่งการสร้างนิโคตินในใบยาสูบด้วยเพราะว่านิโคตินเปลี่ยนมาจากโปรตีนหรือกรดอะมิโน ซึ่งโปรตีนหรือกรดอะมิโนนี้ก็สร้างขึ้นจากไนโตรเจนนั่นเอง (De Jong, 1991) และเมื่อเปรียบเทียบกับใบยาสูบที่ปลูกโดยทั่วไปพบว่ามีใบยาสูบที่ปลูกโดยทั่วไปมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า แต่เนื่องจากการปลูกยาสูบตามภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเป็นโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบควรจะปลูกในฤดูกาลเพาะปลูกและใช้เวลาในการปลูกนาน ดัง

นั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงนำใบยาสูบที่ปลูกโดยทั่วไปมาศึกษาในขั้นต่อๆ ไป อย่างไรก็ตามควรศึกษาการผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบโดยใช้ยาสูบที่ปลูกโดยภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ต่อไป

5.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบ

โปรตีนในใบยาสูบส่วนมากจะอยู่ในส่วนไซโตพลาสซึมซึ่งมี organell ต่างๆ อยู่มากมาย รวมทั้งสารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาต่างๆ โดยเฉพาะโปรตีนที่อยู่ในรูปของสารอาหารที่เก็บไว้ในเซลโดยมีเยื่อหุ้มไว้ นอกจากนี้โปรตีนในเซลส่วนใหญ่จะเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ (Ellis, 1978; Addy, Whitney และ Chen, 1983) โดยจะมีส่วนของผนังเซลซึ่งประกอบไปด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินซึ่งให้ความแข็งแรงแก่เซลพืชหุ้มเยื่อไว้อีกชั้นหนึ่ง ดังนั้นในการสกัดโปรตีนจากใบพืชจะต้องทำให้ผนังเซลแตกให้มากที่สุดเพื่อให้โปรตีนถูกปล่อยออกมาจากเซลให้ได้มากที่สุด วิธีที่นิยมใช้มากคือการใช้เครื่องมือกลบดและบีบอัดให้เซลพืชแตกแล้วแยกเอาสารละลายออกมาจากส่วนกาก (Kohler และ Knuckles, 1977 Kohler, 1982; De Jong และ Sounders, 1986) หรืออีกวิธีคือการปั่นให้เซลพืชละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นละเอียด (blender) ซึ่งจะต้องใช้สารละลายเป็นตัวสกัดเพื่อให้โปรตีนละลายออกมามากที่สุด (Wang และ Kinsella, 1975; Sheen และ Sheen, 1988)

ในขั้นตอนการสกัดซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้เครื่องปั่นละเอียดและสารละลายเป็นตัวสกัดโดยมีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลให้สามารถสกัดโปรตีนออกมาจากเซลให้ได้มากที่สุด ไม่ว่าจะเป็นชนิดของสารเคมีที่ใช้สกัด อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อสารสกัด ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลาย

5.2.1 ศึกษาผลของค่า pH ที่มีต่อการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบ

จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.7) พบว่า ความสามารถในการละลายของโปรตีนจากใบยาสูบ จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่ง pH ในช่วงที่เป็นด่าง (เบส) ตั้งแต่ 7 ขึ้นไป โปรตีนจะละลายออกมาได้มาก ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนละลายได้ดีในสภาพที่เป็นด่างโมเลกุลของโปรตีนมีทั้งประจุบวกและประจุลบซึ่งจะผลักกันยิ่ง pH สูงประจุยิ่งมากโปรตีนจึงละลายได้ดี (Pomeranz, 1991) ดังนั้นที่ pH สูง จะมีผลทำให้โปรตีนจากใบยาสูบละลายออกมาได้มากขึ้น แต่ถ้าใช้ pH สูงเกินไปแม้ได้ปริมาณโปรตีนสูงแต่โปรตีนบางส่วนจะเสียสภาพไป (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2538) และกรดอะมิโนหรือโปรตีนจะเกิดปฏิกิริยา racemization และ lysinoalanine ซึ่งทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลง เนื่องจากร่างกายไม่สามารถย่อยกรดอะมิโนหรือโปรตีนเหล่านั้นได้และ

ยังมีรายงานว่าทำให้เกิดไตเป็นพิษในหนูทดลองด้วย (Provansal, Cug และ Cheftel, 1975: Woodard และคณะ, 1977) ดังนั้นจึงเลือก pH 7 9 และ 11 เพื่อศึกษาการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบในข้อต่อไป นอกจากนี้ในช่วง pH ที่เป็นกรด pH 3 - 5 โปรตีนมีความสามารถในการละลายต่ำ เนื่องจากใกล้จุดไอโซอิเลคตริก (isoelectric point, IP) ซึ่งที่จุดนี้โปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลง เกิดการรวมตัวกันเป็นตะกอน ดังนั้นจึงเลือก pH ในช่วง 3-5 ไปศึกษาในขั้นตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบ

5.2.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบ

ในขั้นตอนนี้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดได้แก่ ชนิดของสารสกัดที่ศึกษาคือ กลั่นและสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 M (Mattil, 1971; Kung และ Tso, 1978) ถ้าความเข้มข้นตั้งแต่ 0.3 M ขึ้นไปจะทำให้เกิด salting out ได้ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนแทนที่จะละลายโปรตีนออกมา (Lehninger, 1977) อัตราส่วนของใบยาสูบต่อสารสกัด 1:6 1:8 และ 1:10 พร้อมทั้ง ปรับค่า pH ในสารละลาย ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ คือการใช้น้ำกลั่นเป็นสารสกัด ในอัตราส่วน 1:8 pH 9 เนื่องจากว่าการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์นั้น ไอออนเล็ก ๆ ของเกลือจะไปจับหมู่ไอออนในโมเลกุลของโปรตีน ทำให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนลดลง ซึ่งมีผลทำให้การละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองแล้วพบว่า โปรตีนในส่วนของสารละลายโซเดียม-คลอไรด์มีค่ามากกว่าน้ำกลั่น โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ระหว่างน้ำกลั่นกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ และเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่าง ชนิดของสารสกัด อัตราส่วนใบยาสูบต่อสารสกัดที่มีต่อ pH จะพบว่าที่ pH 11 จะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่า pH 9 และ 7 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) กับ pH 9 และเมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้โดยใช้ ชนิดของสารสกัดเป็นน้ำกลั่น pH 9 อัตราส่วน 1: 8 กับ การสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ pH 7 อัตราส่วน 1:8 ซึ่งจะพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกัน ($p > 0.05$) แต่การใช้ pH 9 นอกจากจะมีข้อดีเมื่อมองโดยภาพรวมที่สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้มากกว่าการใช้ pH 7 อีกเหตุผลหนึ่งคือในการสกัดโปรตีนออกจากเซลพืชจะมีส่วนที่เป็นเอนไซม์และ substrate เป็นจำนวนมากในสารละลายที่สกัดได้ซึ่งจะส่งผลในการสูญเสียโปรตีนไป เนื่องจากสารเหล่านั้นทำปฏิกิริยากัน ซึ่งสามารถจะทำให้เอนไซม์ทำงานช้าลงหรือหยุดปฏิริยาได้โดยการปรับ pH ให้สูงกว่า 8 ขึ้นไป (Kohler และ Lyon, 1977; Telek และ Graham, 1983) ดังนั้นจึงควรเลือกที่ pH 8 ขึ้นไปและเลือกใช้น้ำกลั่นเพื่อลดต้นทุนและแรงงานรวมทั้งการปนเปื้อนของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่อาจจะเกิดขึ้นในขั้นตอนการผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบได้ และใน

การทดลองนี้ใช้เครื่องปั่นละเอียดขนาด 1000 มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างใบยาสูบต่อสารสกัดเป็น 1:8 พบว่า สารละลายจะท่วมถึงส่วนที่เป็นใบพัด ทำให้เกิดการปั่นละเอียดได้สะดวกนอกจากนี้การปรับ pH เป็น 9 ซึ่งโปรตีนจะละลายออกมาได้ดี นอกจากนี้ในภาวะที่เป็นด่าง จะพบว่ากรดอะมิโนจะเกิด racemization เปลี่ยนจากรูป L form เป็น D form ซึ่งเป็นพิษต่อไต การเกิดปฏิกิริยา racemization จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วที่ pH ตั้งแต่ 11 ขึ้นไป (Schwass และ Finley, 1984) และอาจเกิด lysinoalanine ซึ่งทำให้สูญเสียกรดอะมิโนชนิดจำเป็นไปได้ (Fennema, 1996)

5.3 <u>ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบ</u>

การตกตะกอนโปรตีนสามารถใช้ได้ทั้ง pH ความร้อน หรือสามารถใช้ pH ร่วมกับการใช้ความร้อนได้

5.3.1 ศึกษาภาวะการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบด้วยการปรับ pH

ศึกษา pH ที่มีผลต่อการตกตะกอนโปรตีน pH ที่ศึกษาคือ 3.4 3.6 3.8 4.0 4.2 4.4 4.6 4.8 และ 5.0 จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.7) พบว่า ที่ pH 4.0 โปรตีนตกตะกอนมากที่สุดเมื่อเทียบกับ pH อื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับบุญชิดา โฆษิตทรัพย์ (2534) ซึ่งศึกษาการตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายโปรตีนจากใบผักตบชวาจะตกตะกอนได้มากที่สุดที่ pH 4.0 ซึ่งใกล้จุดไอโซอิเลคตริก (IP) Betschart และ Kinsella (1973) ศึกษาการสกัดโปรตีนจากใบของอัลฟัลฟา ใบถั่ว cowpea ใบถั่วลิสง และใบถั่วเหลือง พบว่าช่วง pH 3.7-4.2 สกัดโปรตีนได้น้อยที่สุด และการศึกษาของ Lu และ Kinsella (1972) สกัดโปรตีนได้น้อยที่ pH 3.5-4.5 ซึ่งใกล้เคียงกับ IP ซึ่งมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ จึงไม่มีการผลักกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนทำให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนมีมากกว่า โปรตีนจึงจับตัวกันและตกตะกอนลงมา (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2538; Pomeranz, 1991)

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7 พบว่า pH ในช่วงกรดมีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทำให้โปรตีนละลายได้น้อย (ตกตะกอน) ซึ่งจะเห็นได้ว่าภาวะการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบที่ดีที่สุดคือมี pH 4.0 ซึ่งที่ pH นี้เป็น pH ที่ใกล้จุดไอโซอิเลคตริกของโปรตีนนั่นเองซึ่งทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็น 0 ทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมา (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2538)

5.3.2 ศึกษาภาวะการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบด้วยความร้อน

การตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนจะต้องศึกษาควบคู่ไปกับเวลาที่ให้ความร้อนนั้นๆ

5.3.2.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบด้วยความร้อน

จากการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลในการตกตะกอน อุณหภูมิที่ศึกษาคือ 50 55 60 65 70 75 80 85 90 และ 95 °C จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.8) จะเห็นได้ว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการตกตะกอนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิต่ำโปรตีนจะตกตะกอนได้น้อย และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นโปรตีนยิ่งตกตะกอนมากขึ้นและจะตกตะกอนได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 95 °C รองลงมาคือ 90 และ 85 °C ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกที่อุณหภูมิ 85 °C ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ostrowski (1983) ซึ่งตกตะกอนโปรตีนจากหญ้าชนิดหนึ่งได้ปริมาณโปรตีนสูงสุดที่อุณหภูมิ 85°C นอกจากนี้ความร้อนจะช่วยลดการปนเปื้อนอันเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์และช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ไม่ต้องการด้วย (Hood และ Brunner , 1975)

5.3.2.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบด้วยความร้อน

จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่า เวลาที่เหมาะสมคือ 30 นาที ทั้งนี้เป็นเวลาที่นานพอที่จะก่อให้เกิดการตกตะกอนด้วยความร้อนได้ ถ้าเวลาน้อยกว่านี้ก็จะเกิดการตกตะกอนได้ไม่สมบูรณ์ แต่ถ้ามากกว่านี้ก็จะเสียพลังงานและเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ (denature) มากยิ่งขึ้น (Vinconneau, 1979)

5.3.3 ศึกษาภาวะการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบด้วยการปรับ pH ร่วมกับความร้อน

จากการศึกษาภาวะการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบด้วย pH ร่วมกับความร้อน (รูปที่ 4.10) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าทั้ง pH และความร้อนมีอิทธิพลร่วมกันต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนจากใบยาสูบ และภาวะที่เหมาะสมคือเมื่อใช้ pH 4.0 ร่วมกับอุณหภูมิ 80 °C นาน 30 นาที ทั้งนี้เนื่องจากการตกตะกอนด้วย pH จะเป็นการทำให้ประจุสุทธิของสารละลายเป็นศูนย์ ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมาและเมื่อใช้ร่วมกับอุณหภูมิ ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 40 °C ขึ้นไปโปรตีนจะเริ่มเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติทำให้ตกตะกอนลงมาเช่นกัน อย่างไรก็ตามการใช้ pH ร่วมกับอุณหภูมิ จะได้ปริมาณตะกอนโปรตีนสูงกว่าการใช้ pH หรือใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว (Lawhon และ Cater, 1971)

หลังจากขั้นตอนการสกัดและตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบแล้วจะต้องทำให้แห้งเพื่อเก็บรักษาไว้ได้นาน ซึ่งจะทำแห้งด้วยวิธีแบบแช่เยือกแข็งโดยอาศัยหลักการทำให้ตะกอนโปรตีนแข็งแล้วจึงไประเหิดเอาน้ำออกไป จะได้โปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบมีลักษณะเป็นผงสีเขียวมีกลิ่นหอมคล้ายใบชาจีน มีความชื้น 5.26% ซึ่งในอาหารแห้งทั่วไปถ้ามีความชื้นต่ำกว่า 6 % จะสามารถเก็บไว้ได้นาน (Pomeranz, 1991) แล้วจึงนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

5.4 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ มีโปรตีนอยู่สูงถึง 51.81 % ไขมัน 11.47 % เส้นใย 0.14 % เถ้า 5.02 % คาร์โบไฮเดรต 31.56 % และไม่มีนิโคตินเหลืออยู่เลย จะเห็นได้ว่ามีปริมาณโปรตีนอยู่สูง และมีไขมันสูงด้วย ไขมันนี้เป็นส่วนของน้ำมันหอมระเหยในใบยาสูบ ซึ่งจะมีกลิ่นหอมคล้ายใบชา และมีเส้นใยอยู่น้อยเนื่องจากในขั้นตอนการสกัดมีการแยกเอาส่วนที่เป็นเส้นใยออกโดยผ่านตะแกรงขนาด 50 เมช นอกจากนี้ยังมีเถ้า 5.02 % ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนการสกัดและตกตะกอนโปรตีนมีการใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 N ในการปรับ pH ซึ่งจะทำให้เกิดเกลือ (NaCl) ขึ้น เมื่อวิเคราะห์ออกมาจะอยู่ในรูปของเถ้านั่นเอง ในส่วนของสารนิโคตินซึ่งจากเดิมที่มีอยู่ในใบยาสูบที่นำมาผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ 0.74 % ปรากฏว่าไม่มีสารนิโคตินเหลืออยู่เลย ทั้งนี้เนื่องจากนิโคตินเป็นอัลคาลอยด์ (alkaloid) ที่ละลายได้ดีในน้ำ (Fennema, 1996) ซึ่งในขั้นตอนการสกัดมีการใช้น้ำเป็นสารสกัด ทำให้นิโคตินถูกกำจัดออกไปหมด และในการศึกษาการผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบตามขั้นตอนต่างๆ จะได้ปริมาณโปรตีนในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิต จากตารางที่ 4.13 จะเห็นว่ามีโปรตีนอยู่ในส่วนกากอยู่มากเนื่องจากโปรตีนจะมีทั้งชนิดละลายน้ำได้และไม่ละลายน้ำ ในขั้นตอนการสกัดจะมีน้ำเป็นตัวละลายให้โปรตีนละลายออกมาซึ่งโปรตีนส่วนนี้จะเป็นชนิดที่ละลายในน้ำได้ซึ่งจะมีอยู่ประมาณ 50 % ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Byers, 1983) ส่วนโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำจึงติดไปอยู่ในส่วนของกากทำให้ปริมาณโปรตีนในส่วนกากมีค่าสูง และจะพบว่าต้องใช้ใบยาสูบเป็นปริมาณมากจึงจะสามารถผลิตโปรตีนเข้มข้นโดยที่ใช้ใบยาสูบแห้ง 100 กรัม จะได้ปริมาณโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ 5.07 กรัม ทั้งนี้เนื่องจากในใบยาสูบจะมีส่วนของเส้นใยอยู่มาก ซึ่งเส้นใยนี้อาจจะไปขัดขวางการสกัดโปรตีนหรือดูดซับเอาสารละลายโปรตีนไว้จึงได้ปริมาณโปรตีนน้อยและขั้นตอนการผลิตอาจจะยังไม่สามารถทำให้เซลพืชแตกได้ทั้งหมด เนื่องจากประสิทธิภาพของเครื่องมือและวิธีการสกัด การตกตะกอนหรือวิธีการทำแห้ง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาวิธีการผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบพบว่าปริมาณโปรตีนในโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบมีปริมาณสูงถึง 51.81 % ซึ่งนับว่ามีโปรตีนอยู่ในปริมาณสูง

นอกจากนี้ในการหาปริมาณโปรตีนจะใช้วิธี micro-Kjeldahl ซึ่งจะหาในรูปของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดแล้วจึงนำมาคูณด้วย 6.25 จึงจะเป็นค่าปริมาณโปรตีน แต่ทั้งนี้ปริมาณไนโตรเจน 70-75 % ของไนโตรเจนทั้งหมดจะเป็นโปรตีนที่แท้จริง (Byers, 1983) ส่วนที่เหลือจะอยู่ในรูปสารประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่โปรตีน

5.5 ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

โดยวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้งชนิดจำเป็นและไม่จำเป็น เปรียบเทียบกับค่าที่ FAO กำหนด ดังตารางที่ 4.14 ซึ่งจะเห็นได้ว่า โปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ มีกรดอะมิโนชนิดจำเป็น คือ threonine leucine tyrosine และ phenylalanine สูงกว่าที่ FAO กำหนด แต่ valine methionine isoleucine และ lysine ต่ำกว่าที่ FAO กำหนด และเมื่อพิจารณาค่า amino acid score พบว่า กรดอะมิโน valine เป็น limitting amino acid ซึ่งในโปรตีนจากใบอัลฟัลฟามี methionine เป็น limitting amino acid (Byers, 1983) นอกจากนี้ยังกรดอะมิโนชนิดไม่จำเป็นอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นเราสามารถเสริมโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบนี้รวมกับอาหารชนิดอื่น ๆ ได้

5.6 ศึกษาสมบัติการใช้งานของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

โปรตีนมีหน้าที่สำคัญ 2 ประการ คือ เป็นสารอาหาร และเป็นสารปรุงแต่ง ซึ่งหน้าที่เป็นสารปรุงแต่งนี้จะต้องอาศัยสมบัติของโปรตีนที่เรียกว่า สมบัติการใช้งาน (functional property) ซึ่งมีหลายประการ เช่น ความสามารถในการดูดซับน้ำ และจับตัวกับน้ำ การดูดซับน้ำมัน และการจับตัวกับน้ำมัน การละลาย การเกิดอิมัลชัน การเกิดโฟม เป็นต้น (Sheen, 1989; Sheen, 1991)

เมื่อผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบตามภาวะที่เหมาะสมที่สรุปได้ทั้งจากภาวะการสกัดและการตกตะกอนที่เหมาะสมดังกล่าวมาแล้ว นำตะกอนโปรตีนที่มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลวมาทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้คือโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบมาวิเคราะห์สมบัติการใช้งาน ได้แก่ การดูดซับน้ำ การดูดซับน้ำมัน การละลาย การเกิดอิมัลชัน และการเกิดโฟม ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.15-4.18 และรูปที่ 4.11

5.6.1 ความหนาแน่น การดูดซับน้ำและน้ำมัน

ผลของสมบัติการใช้งานด้านความการดูดซับน้ำ และการดูดซับน้ำมันจะมีให้ลักษณะของผลิตภัณฑ์ เช่น ลักษณะเนื้อสัมผัส และ ความชุ่ม เป็นต้น

โปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบมีค่าการดูดซับน้ำ 2.29 มิลลิลิตรน้ำต่อกรัมโปรตีน และการดูดซับน้ำมัน 4.48 มิลลิลิตรน้ำมันต่อกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Sheen และ Sheen (1988) ที่ศึกษาการดูดซับน้ำและน้ำมันของ soy protein isolate มีชื่อทางการค้าว่า Ardex R (pH 4.5) พบว่ามีค่าการดูดซับน้ำเป็น 219 % และค่าการดูดซับน้ำมันเป็น 128 % ซึ่งค่าการดูดซับน้ำและน้ำมันจะขึ้นอยู่กับความหนาแน่น (bulk density) ด้วย ซึ่งความหนาแน่นของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบมีค่าเท่ากับ 0.47 % กรัมต่อมิลลิลิตร และของ soy protein isolate Ardex R มีค่าเท่ากับ 0.47 กรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากัน การจับตัวกับน้ำเกิดจากกลุ่มไนโตรเจน และออกซิเจนมีอิเลกตรอนอิสระ (unshared electron) 1 คู่ เป็นอิเลกตรอนที่สามารถมีพันธะกับไฮโดรเจนได้ ซึ่งทั้งไนโตรเจนที่อยู่ในพันธะเปปไทด์ และไนโตรเจนที่อยู่ในกลุ่มอะมิโนอิสระก็มีลักษณะเช่นเดียวกัน มีประจุบวกที่สามารถมีพันธะกับออกซิเจนของน้ำได้ ออกซิเจนที่อยู่ในกลุ่มคาร์บอกซิลหรือคาร์บอนิลจะมีประจุลบค่อนข้างสูง ก็สามารถจับตัวกับไฮโดรเจนของน้ำได้ด้วยพันธะที่แข็งแรงกว่าการจับตัวของไนโตรเจน นอกจากนี้โมเลกุลน้ำยังสามารถจับตัวกันเองด้วย (Pomeranz, 1991) โปรตีนแต่ละชนิดสามารถจับตัวกับน้ำได้ไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับกรดอะมิโนที่ประกอบกันเป็นโปรตีนนั้น โปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่มีขั้วจำนวนมากจะจับตัวกับน้ำได้ดี และโปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วจำนวนมากจะจับตัวกับน้ำมันได้ดี (Kinsella, 1976) ซึ่งจะเห็นได้จากผลการทดลอง นั่นคือโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบมีโปรตีนที่มีขั้ว และไม่มีขั้วในปริมาณที่มากกว่า soy protein isolate

5.6.2 การละลาย

การละลายของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบขึ้นอยู่กับ pH และความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ดังผลการทดลองรูปที่ 4.11 ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า โปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบละลายได้ต่ำที่สุดในสารละลายชนิดต่างๆ ที่ pH 4.0 ทั้งนี้เนื่องจากเป็นจุดไอโซ-อิเลคตริก ซึ่งมีประจุสุทธิเป็น 0 เป็นผลให้การละลายของโปรตีนต่ำสุด และจากผลการทดลองยังพบอีกว่า เมื่อใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 M โปรตีนจะละลายได้มากกว่าการใช้น้ำกลั่นหรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 M โดยทั่วไปถ้าความเข้มข้นของเกลือมากกว่า 0.3 M จะทำให้เกิด "salting out" คือ อิออนของเกลือจะแย่งโมเลกุลน้ำจากโปรตีน จนถึงภาวะที่ปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับน้ำเหลือน้อยกว่าปฏิกิริยา (interaction) ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนจะจับตัวกันและตกตะกอนลงมา (Lehninger, 1977) ทำให้การใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 M มี % nitrogen solubility ต่ำกว่าการใช้น้ำ และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 M

5.6.3 การเกิดอิมัลชัน

การเกิดอิมัลชันเกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนไม่มีขั้วบนผิวของโมเลกุล เนื่องจากการเกิดอิมัลชันเป็นผลมาจากการดูดซับโมเลกุลโปรตีนไว้บนผิวของเม็ดน้ำมัน กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วจะทำให้โปรตีนสามารถเกาะอยู่บนผิวน้ำมันได้ดี (Hall, 1996) ดังนั้นโปรตีนที่มีสัดส่วนของกรดอะมิโนไม่มีขั้วสูงจะทำให้เม็ดน้ำมันดูดซับได้มาก อิมัลชันจึงเกิดได้ดี อย่างไรก็ตามโปรตีนที่จะทำหน้าที่เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีต้องละลายน้ำได้ดีด้วย

จากผลการทดลองตารางที่ 4.16 และ 4.17 พบว่าสารละลายโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อ emulsifying activity (EA) และ emulsion stability (ES) ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการศึกษาในโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟ่า (Wang และ Kinsella, 1976a) ทั้งนี้เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์ 1 M ทำให้เกิดปฏิกิริยา salting out โปรตีนตกตะกอน หรือ โปรตีนไม่ละลายอยู่ในสารละลายทำให้โปรตีนที่มีกรดอะมิโนไม่มีขั้วไม่ละลายอยู่ในสารละลายทำให้ไม่มีผลในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ระหว่างน้ำกับน้ำมันที่เติมลงไป และการเติมน้ำตาลทราย มีผลทำให้ emulsifying activity เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อ emulsion stability การเพิ่มขึ้นของ emulsifying activity ของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ ที่เป็นผลมาจากการทำละลายอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มน้ำให้แก่โปรตีนเป็นผลให้โปรตีนละลายได้มากขึ้น และทำให้มีกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้วมากขึ้นจึงทำให้ emulsifying activity เพิ่มขึ้น (Wang และ Kinsella, 1976a) อย่างไรก็ตามการเพิ่มน้ำตาลจะไม่ทำให้ emulsifiying stability เปลี่ยนแปลง และจากผลการทดลองจะเห็นว่าค่า ES มีค่าสูงกว่าค่า EA ซึ่งงานวิจัยของ Wang และ Kinsella (1976a) ศึกษาสมบัติการใช้งานของโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาก็ได้ผลการทดลองเช่นเดียวกันคือค่า ES มากกว่า EA ซึ่งเกิดจากการที่ในขั้นตอนหาค่า ES จะมีการผ่านความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้โปรตีนเข้มข้นความเข้มข้นมากกว่า 2.75 % ขึ้นไปจะส่งผลให้ฟิล์มโปรตีนบนเม็ดน้ำมันเกิดการสูญเสียสภาพของโปรตีนซึ่งจะมีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนที่ห่อหุ้มเม็ดน้ำมันไว้มีความคงตัว ซึ่งเกิดจากการจับกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีนในโมเลกุลของโปรตีนเข้มข้น นอกจากนี้การให้ความร้อนแก่โปรตีนนี้ยังทำให้กรดอะมิโนพวกไม่มีขั้วคลายตัวออกมาจากโมเลกุลมากยิ่งขึ้นจึงทำให้ทำปฏิกิริยากับน้ำมันได้มากยิ่งขึ้นค่า ES จึงสูงกว่า EA (Ivey, Webb และ Jones, 1970) และเมื่อมีการใช้สารละลายน้ำตาลพบว่าจะมีค่า EA สูงกว่าการใช้น้ำกลั่นเพียงอย่างเดียวและสูงกว่าการใช้สารละลาย (Wang และ Kinsella, 1976a)

5.6.4 การเกิดโฟม

การเกิดโฟมในอาหารเกิดขึ้นจากการที่เอาอากาศเข้าไปในส่วนผสมเกิดชั้นโฟมอากาศและชั้นของเหลว โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของผนังโฟม ทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวของชั้นรอยต่อ โปรตีนละลายอยู่ในชั้นน้ำจะเคลื่อนตัวไปที่รอยต่อของชั้นกาซและของเหลว โปรตีนจะรัดตัวเองให้หมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ชี้เข้าสู่ชั้นอากาศ และหมู่ชอบน้ำ (hydrophilic) ชี้เข้าสู่ชั้นของเหลว ซึ่งจะทำให้เกิดโฟมหรือฟองอากาศเป็นจำนวนมาก (Pomeranz, 1991)

จากผลการทดลองตารางที่ 4.18 จะพบว่า pH มีผลต่อ foaming activity และ foam stability ทั้งนี้เนื่องจากที่ pH ที่โปรตีนจะละลายได้ดี จะมี foam activity และ foam stability สูง เนื่องจากเมื่อโปรตีนละลายมากก็จะมีพวกกรดอะมิโนที่มีขั้วกับไม่มีขั้วละลายออกมามากทำให้มี foam activity สูง (Lawhon, Cater และ Mattil, 1972; Wang และ Kinsella, 1976b) ส่วน foam stability pH ก็มีผลเช่นเดียวกัน กล่าวคือ ที่จุดไอโซอิเลคตริก (pH 4) โปรตีนจะไม่มีความเสถียรเลย และจะมีความเสถียรต่ำที่ pH 3 และ 5 และจะมีความเสถียรมากยิ่งขึ้นช่วง pH 6-7 และจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อ pH อยู่ในช่วงเบส ซึ่งเป็นผลจากการละลายของโปรตีนที่ pH เป็นเบสสูง

จากการศึกษาโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ พบว่าโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเขียวปนน้ำตาลอ่อนเนื่องจากมีส่วนของรงควัตถุคลอโรฟิล มีกลิ่นหอมอ่อนๆ คล้ายใบชาจีน มีค่าความหนาแน่น 0.47 กรัมต่อมิลลิลิตร ค่าการดูดซับน้ำ 2.29 มิลลิลิตรต่อกรัมน้ำหนักโปรตีน และมีค่าการดูดซับน้ำมัน 4.48 มิลลิลิตรต่อกรัมน้ำหนักโปรตีน ละลายได้ดีในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 M ได้ดีกว่าน้ำกลั่นและสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 M ตามลำดับและละลายได้ดีที่ pH ตั้งแต่ 7 ขึ้นไป ความสามารถในการเกิดอิมัลชันจะยิ่งเกิดได้ดีเมื่อเติมน้ำตาลแต่ความเสถียรของอิมัลชันต่ำและมีความสามารถในการเกิดโฟมได้ดีที่ pH ตั้งแต่ 7 ขึ้นไปแต่ความเสถียรของโฟมต่ำ