บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุดิบ

- ใบยาสูบพันธุ์เวอร์ยิเนีย (สายพันธุ์ K326) และพันธุ์เบอร์เลย์ (สายพันธุ์ Ky14) ตัดส่วนลำต้นเหนือดิน ล้างน้ำ ผึ่งลมให้แห้ง ขนส่งทางรถไฟจากสถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ และขนส่งทางรถโดยสารปรับอากาศจากกิ่งอำเภอ แม่ลาว จ. เชียงราย ใช้เวลาในการเดินทางเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง โดยบรรจุในถุงกระดาษขนาดใหญ่ใส่ในกล่องกระดาษที่เจาะรูเพื่อระบายอากาศโดยรอบ จากนั้นนำมาบรรจุในถุงพลาสติกขนาดใหญ่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 12 ถึง 15 องศาเซลเซียส ใช้ทดลองให้หมดภายใน 24 ชั่วโมง

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

Boric acid	(A.R.)
Bromocresol green	(A.R.)
Copper sulphate	(A.R.)
Ferric alum indicator	(A.R.)
Kjeltab	(A.R.)
Methyl red	(A.R.)
Nitric acid	(A.R.)
Petroleum ether	(A.R.)
Potassium thiocyanate	(A.R.)
Sulfuric acid	(A.R.)
Sodium hydroxide	(A.R.)
Silver nitrate	(A.R.)
Hydrochloric acid	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยเพื่อผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

Hydrochloric acid	(A.R.)
Sodium hydroxide	(A.R.)
Sodium chloride	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้ศึกษาสมบัติทางการใช้งานของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

Boric acid	(A.R.)
Bromocresol green	(A.R.)
Copper sulphate	(A.R.)
Kjeltab	(A.R.)
Methyl red	(A.R.)
Sulfuric acid	(A.R.)
Sodium hydroxide	(A.R.)
Hydrochloric acid	(A.R.)
Sodium chloride	(A.R.)
Sugar	(commercial grade)
Corn oil	(commercial grade)

อุปกรณ์

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง พิกัดการชั่ง 202 กรัม(Sartorius, A200S)

เครื่องชั่งหยาบทศนิยม 2 ตำแหน่ง พิกัดการชั่ง 3100 กรัม (Sartorius, 1907MPB)

นาฬิกาจับเวลา (Cannon, CT-10)

ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน (Kjeldatherm and Vapodest 1, Gerhardt, KT 85)

ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet Apparatus)

ตู้อบลมร้อน ช่วงอุณหภูมิ 0-250 °C (WTE Binder, E 53)

เตาเผาช่วงอุณหภูมิ 500-700 °C (Furnace Carbolite, MEL 11-2)

เครื่อง amino acid analyzer (Beckman, High Performance Analyzer System 6300)

ชุดเครื่อง HPLC (Constametric, 3200 and 3500; Spectra System AS 3000 and UV 2000)

การผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

เครื่องปั่นละเอียด (Blender 8010, 32BL79) ขนาด 1000 ml.

เครื่องกวนด้วยแม่เหล็ก (Agimetic - N)

เครื่องเหวี่ยงแยกแบบตะกร้า (Heraeus Christ, Varifuge F)

เครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิ (Heraeus Christ, Varifuge K)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heto, DT Hetotherm, CB 60 - VS01)

เครื่องวัด pH (Horiba, F-21 E)

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง พิกัด 3100 กรัม (Sartorius, 1907MBP)

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 1 ตำแหน่ง พิกัด 8100 กรัม (Mettler Toledo, PB8001)

นาฬิกาจับเวลา (Cannon, CT-10)

เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Heto, FD3)

ตะแกรงร่อนขนาด 40 และ 50 เมช

การศึกษาสมบัติการใช้งานของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง พิกัดการชั่ง 202 กรัม (Sartorius, A200S)

ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน (Kjeldatherm and Vapodest 1, Gerhardt, KT 85)

นาฬิกาจับเวลา (Cannon, CT-10)

เครื่องปั่นละเอียด (Blender 8010, 32BL79) ขนาด 100 ml.

เครื่องกวนด้วยแม่เหล็ก (Agimetic - N)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heto, DT Hetotherm, CB 60 - VS01)

เครื่องวัด pH (Horiba, F-21 E)

เครื่องตีผสม (Airlux, HA-3127)

เครื่องเหวี่ยงแยก (Heraeus Christ, Labofuge 15000)

เครื่องเหวี่ยงแยก (PLC - 03)

ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ศึกษาพันธุ์และภาวะการปลูกต้นยาสูบที่เหมาะสมเพื่อใช้ผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

3.1.1 ศึกษาพันธุ์และภาวะการปลูกต้นยาสูบที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในใบยาสูบ ได้แก่ พันธุ์ยาสูบ อายุการเก็บเกี่ยว ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนและระยะปลูก ปลูกที่ไร่ของสถานีทดลองยาสูบ อ. แม่โจ้ จ. เชียงใหม่ โดยปลูกทั้งหมด 3 ครั้ง

ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่

- พันธุ์ของต้นยาสูบ 2 พันธุ์คือ พันธุ์เวอร์ยิเนีย (K326) และพันธุ์เบอร์เลย์ (Ky14)
- อายุการเก็บเกี่ยว 5 ระยะ คือ 2 4 6 8 และ 10 สัปดาห์
- ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 3 ระดับ คือ 0 10 และ 20 กิโลกรัมต่อไร่
- ระยะปลูก 2 ระยะ คือ 10 x 25 และ 10 x 50 ตารางเซนติเมตร

ปลูกทั้งหมด 3 ครั้ง (crop)

ครั้งที่ 1 พ.ย. 39 - ม.ค. 40 ปลูกในฤดูกาลเพาะปลูก

ครั้งที่ 2 ส.ค. 40 - ต.ค. 40 ปลูกนอกฤดูกาลเพาะปลูก

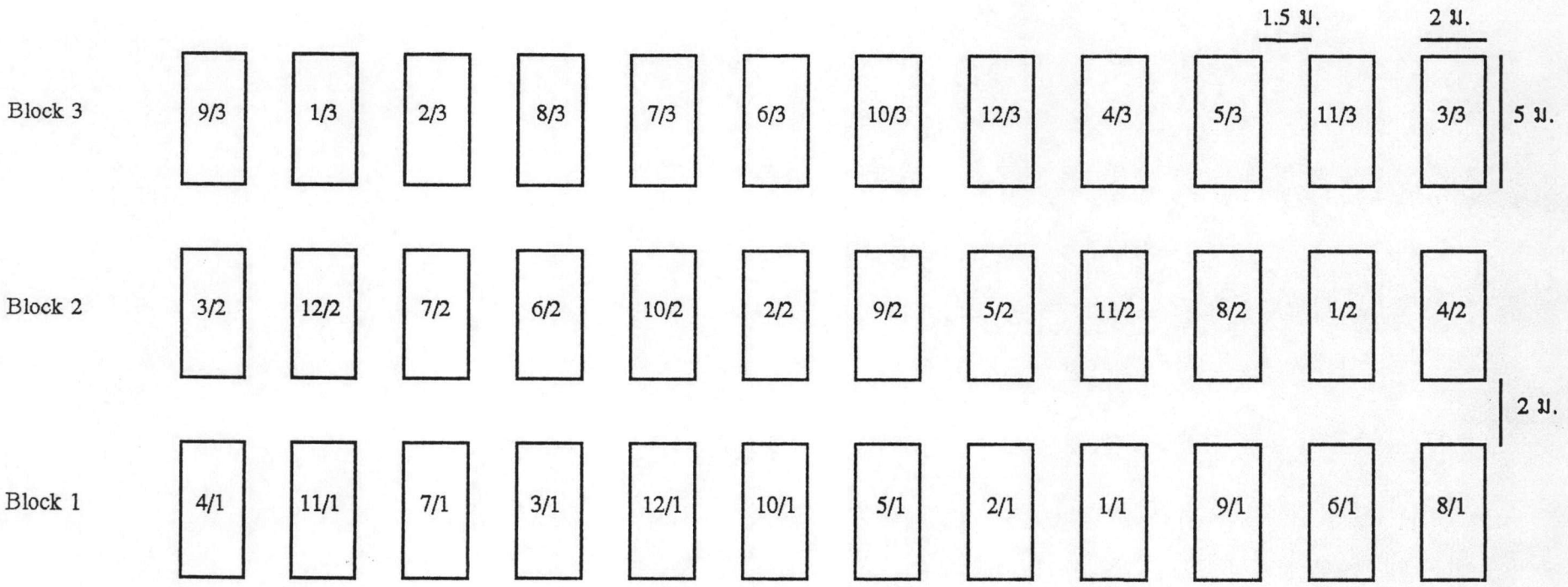
ครั้งที่ 3 พ.ย. 40 - ม.ค. 40 ปลูกในฤดูกาลเพาะปลูก

ขั้นตอนการศึกษา นำใบยาสูบแต่ละภาวะการปลูกมาล้างทำความสะอาดเพื่อกำจัดเศษดินออกผึ่งลมให้แห้ง หลังจากนั้นกรีดเอาเส้นกลางใบและก้านใบออกแล้วหั่นใบยาเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1 x 1 ตารางเซนติเมตร สุ่มตัวอย่าง 2 กรัม นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (A.O.A.C., 1995)

วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Experiment with Randomized Complete Block Design ขนาด 2x5x3x2 ทำ 3 แปลง (block) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกภาวะที่มีปริมาณโปรตีน (% โดยน้ำหนักแห้ง) สูงสุดเพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

ยาสูบที่ใช้ในการทดลองนี้ได้มาจากไร่ทดลองยาสูบของ สถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ ซึ่งมีขั้นตอนการเพาะปลูกดังภาคผนวก ข. และมีแบบแปลงเพาะปลูกดังรูปที่ 3.1 ดังนี้

1. K326 N_0 S10x25 พันธุ์เวอร์ยิเนีย ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 0 ก.ก./ไร่ ระยะปลูก 10x25 ต.ร.ซ.ม.
2. K326 N_{10} S10x25 10 ก.ก./ไร่
3. K326 N_{20} S10x25 20 ก.ก./ไร่
4. K326 N_0 S10x50 พันธุ์เวอร์ยิเนีย ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 0 ก.ก./ไร่ ระยะปลูก 10x25 ต.ร.ซ.ม.
5. K326 N_{10} S10x50 10 ก.ก./ไร่
6. K326 N_{20} S10x50 20 ก.ก./ไร่
7. Ky14 N_0 S10x25 พันธุ์เบอร์เลย์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 0 ก.ก./ไร่ ระยะปลูก 10x25 ต.ร.ซ.ม.
8. Ky14 N_{10} S10x25 10 ก.ก./ไร่
9. Ky14 N_{20} S10x25 20 ก.ก./ไร่
10. Ky14 N_0 S10x50 พันธุ์เบอร์เลย์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 0 ก.ก./ไร่ ระยะปลูก 10x50 ต.ร.ซ.ม.
11. Ky14 N_{10} S10x50 10 ก.ก./ไร่
12. Ky14 N_{20} S10x50 20 ก.ก./ไร่



เก็บเมื่อต้นยาสูบอายุ 2 4 6 8 และ 10 สัปดาห์

รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงแปลงปลูกต้นยาสูบที่ภาวะการปลูกต่าง ๆ

3.1.2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบยาสูบ

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบยาสูบที่ปลูกที่ภาวะที่เหมาะสมในการปลูกเพื่อใช้ผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบและใบยาสูบที่ปลูกที่ภาวะที่ใช้ปลูกทั่วไป

จากการทดลอง 3.1.1 จะได้ยาสูบที่มีภาวะการปลูกที่เหมาะสม คือ มีปริมาณโปรตีนในใบ (% โดยน้ำหนักแห้ง) สูงสุด นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (A.O.A.C., 1995) (ภาคผนวก ก.) เปรียบเทียบกับยาสูบปลูกที่ภาวะที่ใช้ปลูกทั่วไป

ยาสูบปลูกที่ภาวะเหมาะสม : พันธุ์เบอร์เลย์ อายุการเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 20 ก.ก./ไร่ ระยะปลูก 10 x 25 ตารางเซนติเมตร

ยาสูบปลูกที่ภาวะทั่วไป : พันธุ์เบอร์เลย์ อายุการเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน 6 ก.ก./ไร่ ระยะปลูก 60 x 90 ตารางเซนติเมตร

นำใบยาสูบแต่ละภาวะมาล้างน้ำให้สะอาด 2 ครั้ง สะเด็ดน้ำให้แห้งโดยผึ่งลม แล้วนำมากรีดเอาเส้นกลางใบออกหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1 x 1 ตารางเซนติเมตร วิเคราะห์หาองค์ประกอบ ทางเคมีดังต่อไปนี้

- ปริมาณความชื้น (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ก.1)
- ปริมาณโปรตีน (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ก.2)
- ปริมาณไขมัน (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ก.3)
- ปริมาณเส้นใย (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ก.4)
- ปริมาณเถ้า (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ก.5)
- ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ได้จากการคำนวณผลต่างขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดกับผลรวมของปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยและเถ้าที่วิเคราะห์ได้
- ปริมาณนิโคติน (Rothmans International Tobacco (UK) Limited, 1989) อ้างถึงใน ฝ่ายวิจัยและพัฒนา (2532) (ภาคผนวก ก.6)

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design ทดลอง 5 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบ

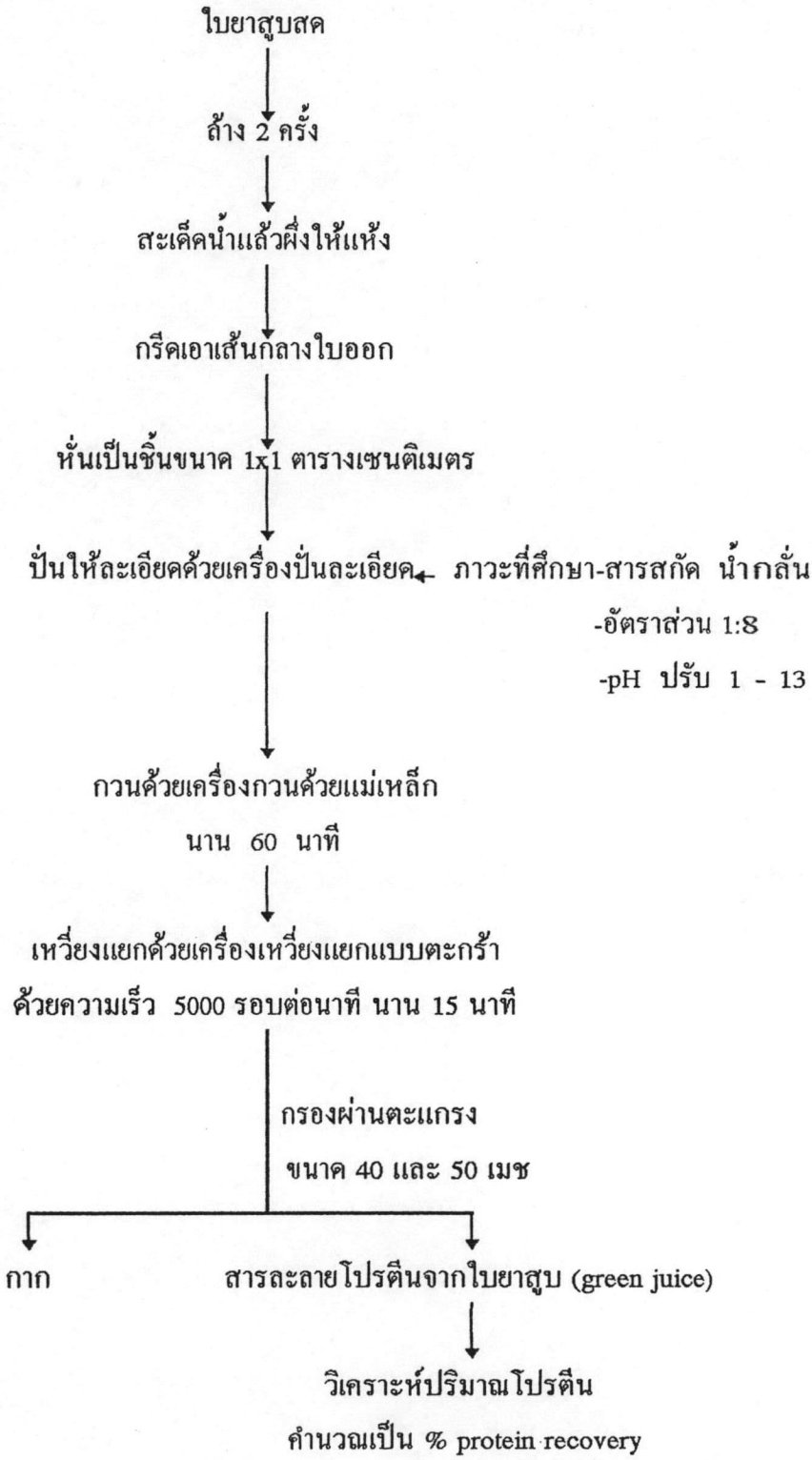
3.2.1 ศึกษาผลของค่า pH ที่มีต่อการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบ

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดมีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนในใบพืชซึ่งจะมีผลต่อผลผลิตและคุณภาพของโปรตีนที่สกัดได้ ดังนั้นจึงศึกษาผลของ pH ที่มีต่อปริมาณโปรตีน โดยศึกษาผลของ pH ตั้งแต่ 1 ถึง 13 ดัดแปลงจากวิธีการสกัดของ Wang และ Kinsella (1975)

ขั้นตอนในการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบแสดงในรูปที่ 3.2 โดยมีรายละเอียดดังนี้ นำใบยาสูบมาล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง เพื่อกำจัดเศษดินและใบที่เสียหายทิ้ง ผึ่งลมให้แห้ง กรีดเอาเส้นกลางใบและก้านใบออก หั่นใบให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 x 1 ตารางเซนติเมตร สกัดโปรตีนโดยใช้อัตราส่วนใบยาสูบต่อน้ำกลั่นเป็น 1:8 โดยใช้น้ำหนักใบยาสูบ 50 กรัมต่อน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 M และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 M ตั้งแต่ pH 1 ถึง 13 ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นละเอียด (Waring blender) ขนาด 1000 มิลลิลิตร ความเร็วต่ำนาน 2 นาที เทใส่บีกเกอร์แล้วกวนด้วยเครื่องกวนด้วยแม่เหล็กนาน 60 นาที ตรวจวัดค่า pH และปรับค่าให้คงที่ทุก 15 นาที เพื่อให้โปรตีนละลายออกมามากที่สุด นำของเหลวทั้งหมดไปเหวี่ยงแยกเอาเศษกากออกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกแบบตะกร้า (basket centrifuge) ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที กรองของเหลวที่ได้ผ่านตะแกรงขนาด 40 และ 50 เมช ตามลำดับ เพื่อกำจัดเศษกากที่เหลืออยู่ออก วัดปริมาตรสารละลายที่ได้แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

$$\% \text{ protein recovery} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีน}}{\text{ปริมาณโปรตีนในใบยาสูบ}} \times 100$$

ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่มีต่อการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบ วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบ

3.2.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบ

เลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบโดยใช้ pH ที่เลือกได้จากข้อ 3.2.1 คือ pH 7 9 และ 11 ซึ่งเป็น pH ที่โปรตีนละลายได้มาก ดัดแปลงวิธีการสกัดของ Wang และ Kinsella (1975) ขั้นตอนและวิธีดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่

- ชนิดของสารสกัด 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 M
- อัตราส่วนระหว่าง ใบยาสูบต่อสารสกัด (w/v) 3 ระดับคือ 1:6 1:8 และ 1:10
- pH ที่ใช้ในการสกัด 3 ระดับ คือ 7 9 และ 11

ศึกษาผลของชนิดของสารสกัด อัตราส่วนระหว่างใบยาสูบต่อสารสกัดและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่มีต่อการสกัดโปรตีนจากใบยาสูบ วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Experiment Design ขนาด 2x3x3 ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกภาวะที่มี % protein recovery สูงสุดเพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.3 <u>ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบ</u>

3.3.1 ศึกษาภาวะการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบด้วยการปรับ pH

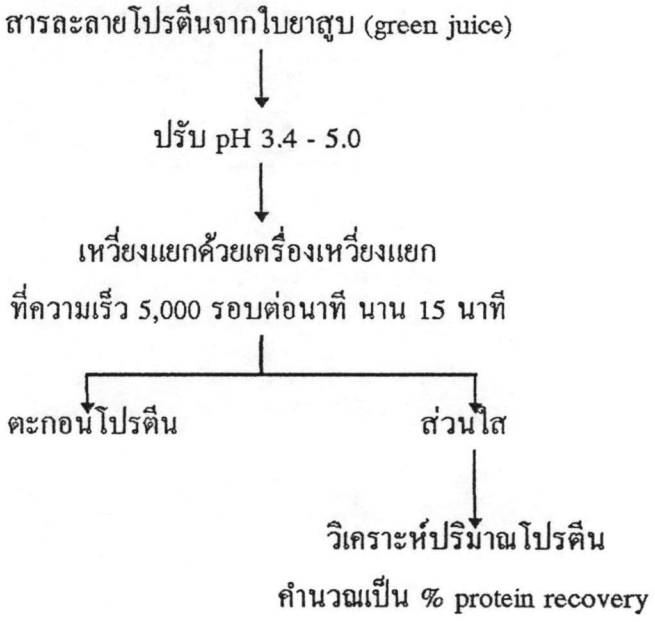
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีผลต่อการตกตะกอนของโปรตีน ดังนั้นจึงศึกษา pH ที่ใกล้จุดไอโซอิเลกตริก (isoelectric point) ที่เลือกได้จากข้อ 3.2.1 คือ 3.4 3.6 3.8 4.0 4.2 4.4 4.6 4.8 และ 5.0 ซึ่งเป็นจุดที่โปรตีนมีความสามารถในการละลายได้ต่ำที่สุด (ตกตะกอนได้มากที่สุด) ดัดแปลงจากวิธีการตกตะกอนโปรตีนจากใบผักตบชวาของ บุญธิดา โฆษิตทรัพย์ (2534)

ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบด้วยการปรับ pH แสดงในรูปที่ 3.3 โดยเริ่มจากนำสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบ (green juice) ที่ได้จากข้อ 3.2.2 มา 10 มิลลิลิตร ปรับ pH ในช่วง 3.4 - 5.0 แล้วจึงนำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอนโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (A.O.A.C., 1995) คำนวณเป็น % protein recovery

$$\% \text{ protein solubility} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนในส่วนใส}}{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลาย}} \times 100$$

$$\% \text{ protein recovery} = 100 - \% \text{ protein solubility}$$

ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่มีต่อการตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบ วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกภาวะที่มี % protein recovery สูงสุดเพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการตกตะกอนสารละลายโปรตีนด้วย pH

3.3.2 ศึกษาภาวะการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบด้วยความร้อน

การตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนนั้นอุณหภูมิและเวลาที่ใช้มีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีน ดังนั้นจึงศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้ตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบ

3.3.2.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบด้วยความร้อน

อุณหภูมิที่ศึกษาคือ 50 55 60 65 70 75 80 85 90 และ 95 °C นาน 30 นาที เลือกภาวะที่โปรตีนมีความสามารถในการละลายได้ต่ำที่สุด(ตกตะกอนได้มากที่สุด) ดัดแปลงจากวิธีการตกตะกอนโปรตีนของ บุญธิดา โฆษิตทรัพย์ (2534) ขั้นตอนการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1

นำสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบ ที่ได้จากข้อ 3.2.2 มา 10 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 60 65 70 75 80 85 90 และ 95 °C ทิ้งไว้จนอุณหภูมิของสารละลายในหลอดทดลองเท่ากับอ่างควบคุมอุณหภูมิแล้วจึงจับเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอนโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (A.O.A.C., 1995) คำนวณเป็น % protein recovery

$$\% \text{ protein solubility} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนในส่วนใส}}{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลาย}} \times 100$$

$$\% \text{ protein recovery} = 100 - \% \text{ protein solubility}$$

ศึกษาผลอุณหภูมิที่มีต่อการตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบ วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกภาวะที่มี % protein recovery สูงสุดเพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.3.2.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบด้วยความร้อน

เวลาที่ศึกษาคือ 10 15 20 25 30 35 และ 40 นาที ที่อุณหภูมิ 85 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 เลือกเวลาที่โปรตีนมีความสามารถในการละลายได้ต่ำที่สุด (ตกตะกอนได้มากที่สุด) ดัดแปลงจากวิธีการตกตะกอนโปรตีนของ บุญธิดา โฆษิตทรัพย์ (2534) ขั้นตอนการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1

ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบด้วยความร้อน เริ่มจากนำสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบ ที่ได้จากข้อ 3.2.2 มา 10 มิลลิลิตร ปรับอุณหภูมิ เป็น

85 °C วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1 โดยแปรเวลาเป็น 10 15 20 25 30 35 และ 40 นาที แล้วจึงนำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอนโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (A.O.A.C.,1995) คำนวณเป็น % protein recovery

$$\% \text{ protein solubility} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนในส่วนใส}}{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลาย}} \times 100$$

$$\% \text{ protein recovery} = 100 - \% \text{ protein solubility}$$

ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ที่มีต่อการตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบด้วยความร้อน วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกภาวะที่มี % protein recovery สูงสุดเพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.3.3 ศึกษาภาวะการตกตะกอนโปรตีนจากใบยาสูบด้วยการปรับ pH ร่วมกับความร้อน

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าทั้ง pH และความร้อนมีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนจากสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบ ดังนั้นจึงศึกษาผลของการใช้ pH ร่วมกับการใช้ความร้อน

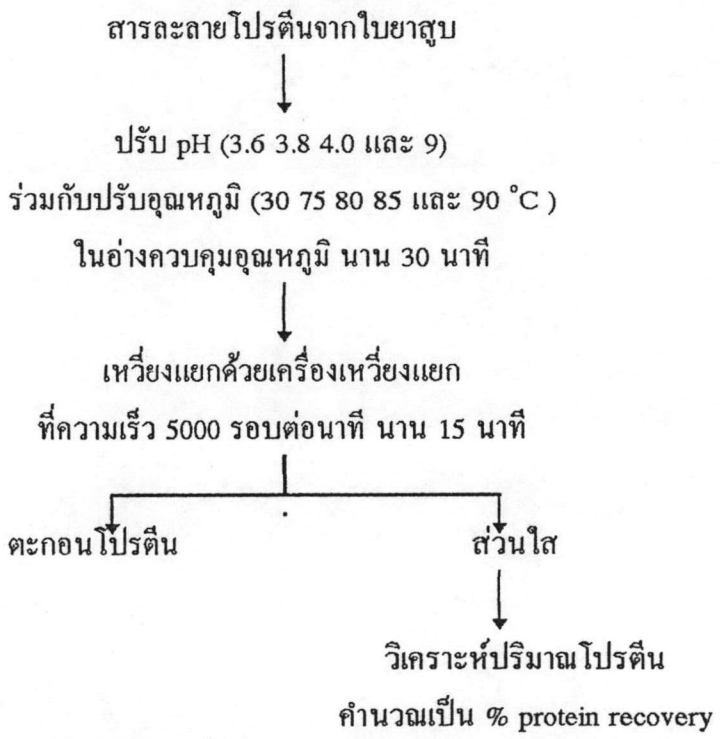
ภาวะ pH ที่ศึกษาคือ 3.6 3.8 4.0 4.2 และไม่ปรับ (9) ร่วมกับอุณหภูมิที่ศึกษาคือ ไม่ปรับ (30) 75 80 85 และ 90 °C เวลา 30 นาที เลือกภาวะที่โปรตีนมีความสามารถในการละลายได้ต่ำที่สุด (ตกตะกอนได้มากที่สุด) ดัดแปลงจากวิธีการตกตะกอนโปรตีนของบุญธิดา โฆษิตทรัพย์ (2534)

ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบด้วยความร้อน นำสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบ ที่ได้จากข้อ 3.2.2 มา 10 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 3.6 3.8 4.0 4.2 และไม่ปรับ (9) ร่วมกับอุณหภูมิที่ศึกษาคือ ไม่ปรับ(30) 75 80 85 และ 90 °C เวลา 30 นาที วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1 แล้วจึงนำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอนโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (A.O.A.C., 1995) คำนวณเป็น % protein recovery ขั้นตอนและวิธีการทดลองดังรูปที่ 3.4

$$\% \text{ protein solubility} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนในส่วนใส}}{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลาย}} \times 100$$

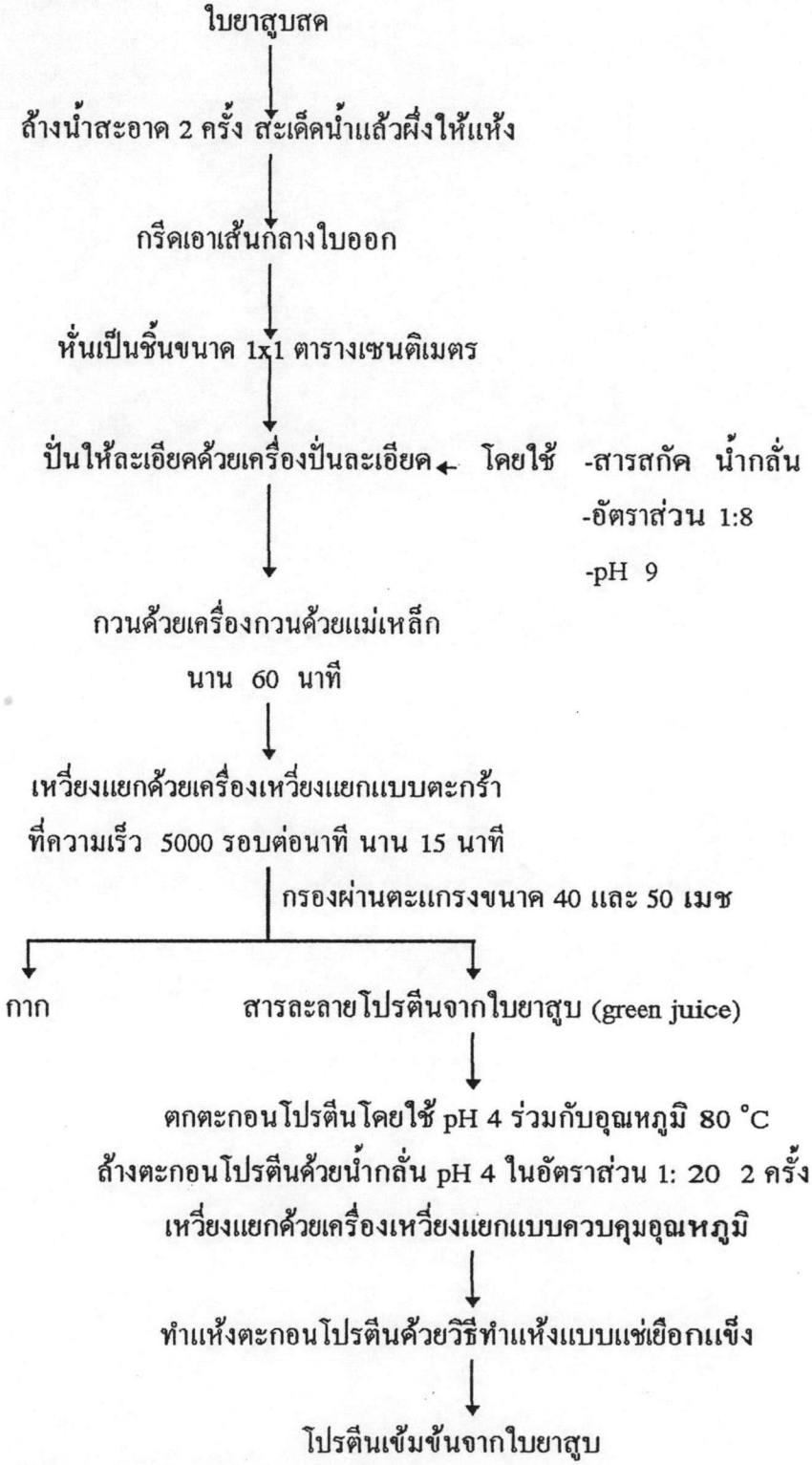
$$\% \text{ protein recovery} = 100 - \% \text{ protein solubility}$$

ศึกษาผลของการใช้ pH ร่วมกับอุณหภูมิที่มีผลต่อการตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายโปรตีนจากใบยาสูบ วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Experiment Design ขนาด 2x3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกภาวะที่มี % protein recovery สูงสุดเพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการตกตะกอนสารละลายโปรตีนด้วย pH ร่วมกับการใช้ความร้อน

จากการทดลองทั้งหมดที่ศึกษาสามารถสรุปเป็นวิธีการสกัดและตกตะกอนเพื่อผลิตเป็นโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

3.4 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

นำโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบที่ผลิตได้ตามภาวะที่สรุปได้จากการทดลองที่ผ่านมาดังรูปที่ 3.5 ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีดังนี้

- ปริมาณความชื้น (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ก.1)
- ปริมาณโปรตีน (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ก.2)
- ปริมาณไขมัน (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ก.3)
- ปริมาณเส้นใย (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ก.4)
- ปริมาณเถ้า (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ก.5)
- ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ได้จากการคำนวณผลต่างขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดกับผลรวมของปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยและเถ้าที่วิเคราะห์ได้
- ปริมาณนิโคติน (Rothmans International Tobacco (UK) Limited, 1989) อ้างถึงใน ฝ่ายวิจัยและพัฒนา (2532) (ภาคผนวก ก.6)
- ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (มอก 8 - 2513) (ภาคผนวก ก.7)

3.5 ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

นำโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบที่ผลิตได้ตามภาวะที่สรุปได้จากการทดลองที่ผ่านมาดังรูปที่ 3.5 ไปหาคุณค่าทางโภชนาการโดยส่งไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน (ภาคผนวก ก.8) ด้วยเครื่อง amino acid analyzer (Beckman, High Performance Analyzer System 6300) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และคำนวนเป็นค่า amino acid score (AA score) ดังนี้คือ

$$\text{amino acid score} = \frac{\text{ปริมาณกรดอะมิโนชนิดจำเป็นที่มีอยู่ในโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ}}{\text{ปริมาณกรดอะมิโนชนิดจำเป็นที่ FAO กำหนด}}$$

3.6 ศึกษาสมบัติการใช้งานของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ

นำโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบที่ผลิตได้ตามภาวะที่สรุปได้จากการทดลองที่ผ่านมาดังรูปที่ 3.5 นำไปหาสมบัติการใช้งานต่างๆ ดังนี้

3.6.1 bulk density (Wang และ Kinsella, 1976) (ภาคผนวก ก.9)

3.6.2 water absorption (Wang และ Kinsella, 1976) (ภาคผนวก ก.10)

3.6.3 fat absorption (Wang และ Kinsella, 1976) (ภาคผนวก ก.11)

3.6.4 solubility (Wang และ Kinsella, 1976) (ภาคผนวก ก.12)

3.6.5 emulsifying activity และ emulsion stability (Wang และ Kinsella, 1976) (ภาคผนวก ก.13)

3.6.6 foaming capacity และ foaming stability (Lawhon และ Cater, 1971) (ภาคผนวก ก.14)