บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ยาสูบ

ยาสูบเป็นพืชในตระกูล Solanaceae อยู่ในจีนัส Nicotiana ซึ่งมีทั้งหมดประมาณ 63 สปีชีส์ ที่ปลูกเป็นเชิงพาณิชย์ คือ Nicotiana tabacum (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532) เมื่อคริสโตเฟอร์ โคลัมบัสค้นพบทวีปอเมริกา โคลัมบัสก็ได้พบว่าชนพื้นเมืองคือพวกอินเดียนแดงมีการใช้ใบยาสูบอยู่ก่อนแล้ว ซึ่งชาวอินเดียนแดงเชื่อว่าเป็นยารักษาโรคได้และใช้เป็นส่วนหนึ่งในพิธีกรรมต่างๆ เช่น แสดงถึงมิตรภาพแก่ผู้มาเยือนโดยการให้ผู้มาเยือนสูบยาสูบ เมื่อโคลัมบัสเดินทางกลับสู่ยุโรปก็ได้นำยาสูบกลับมาด้วยนับเป็นจุดเริ่มต้นของการผลิตบุหรี่ในปัจจุบัน หลังจากยาสูบเข้าสู่ยุโรป ได้แก่ ประเทศฝรั่งเศสในปี ค.ศ. 1556 โปรตุเกสในปี ค.ศ. 1558 สเปนในปี ค.ศ. 1559 และอังกฤษในปี 1565 ผู้มีบทบาทอย่างแท้จริงก็คือ Jean Nicot เอกอัครราชฑูตประเทศฝรั่งเศสประจำกรุงลิสบอนประเทศโปรตุเกส ได้นำเมล็ดยาสูบถวายแด่ Catherine de Medicis พระราชินีแห่งประเทศฝรั่งเศส จึงได้มีการตั้งชื่อจีนัส Nicotiana เพื่อเป็นเกียรติแก่ท่านทูตผู้นี้ หลังจากนั้นยาสูบก็ได้แพร่หลายไปทั่วโลกโดยกลาสีเรือชาวโปรตุเกสและสเปน

การใช้ประโยชน์จากยาสูบส่วนใหญ่ใช้วิธีเผาไหม้ใบยาสูบเพื่อให้ได้รับรสของอัลคาลอยด์ (alkaloid) ที่เรียกว่านิโคตินเป็นหลัก ปริมาณอัลคาลอยด์ทั้งหมดในยาสูบนี้อยู่กับฤดูกาลผลิตและการปฏิบัติในไร่ ในสหรัฐอเมริกายาสูบพันธุ์เวอร์ยิเนีย (บ่มไอร้อน) มีความสำคัญเป็นอันดับหนึ่ง ยาสูบเบอร์เลย์ (บ่มอากาศ) มีความสำคัญเป็นอันดับสอง คุณภาพหรือการใช้ประโยชน์จากยาสูบนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ การปฏิบัติในไร่และการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว การใช้ใบยาสูบอย่างมีประสิทธิภาพนั้นมีความจำเป็นจะต้องเข้าใจระบบสรีรวิทยา (physiology) และกระบวนการชีวเคมี (biochemistry) ของยาสูบ นอกจากนั้นยังต้องมีความเข้าใจถึงวิธีที่จะควบคุมกลไกทางชีววิทยาซึ่งมีผลต่อสมบัติของใบยา สมบัติของควันและการใช้ประโยชน์จากใบยาอีกด้วย (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532)

ใบยาสูบที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตบุหรี่ของโรงงานยาสูบ แบ่งตามสายพันธุ์หรือกรรมวิธีในการบ่มใบยาเป็น 4 ชนิด (วินิจ เฮงประเสริฐ, 2540) คือ

1. ใบยาเวอร์ยิเนีย/บ่มไอร้อน (Virginia/Flue-Cured Tobacco) ใบยาแห้งจะมีกลิ่นหอมตามธรรมชาติคล้ายน้ำผึ้ง องค์ประกอบเคมีมีปริมาณน้ำตาลมาก นิโคตินระดับปานกลาง

2. ใบยาเบอร์เลย์/บ่มอากาศ (Burley/Air-Cured Tobacco) ใบยาแห้งมีกลิ่นคล้ายโกโก้ องค์ประกอบเคมีมีปริมาณน้ำตาลน้อย นิโคตินสูง

3. ใบยาเตอร์กิชหรือใบยาตะวันออก/บ่มแดด (Turkish or Oreintal/Sun-cured Tobacco) มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว องค์ประกอบเคมีมีน้ำตาลและนิโคตินน้อย มีกรดระเหยประเภท beta-methylvaleric acid isovaleric acid และ valeric acid เป็นกลุ่มหลักและมีปริมาณมากซึ่งมีความสำคัญต่อรสชาติและกลิ่นของบุหรี่

4. ยาเส้นพื้นเมือง/บ่มแดด (Domestics/Sun-Cured Tobacco) ยาเส้นแห้งมีกลิ่นฉุน มีสีน้ำตาลเข้ม องค์ประกอบเคมีมีนิโคตินสูง เป็นส่วนผสมสำคัญในบุหรี่รสพื้นเมือง

2.1.1 การเจริญเติบโตของยาสูบ

การเจริญเติบโตของยาสูบหลังการย้ายกล้า อาจแบ่งคร่าวๆ ได้ 3 ช่วงคือ ระยะแรก 3-4 สัปดาห์ต้นกล้าเริ่มตั้งตัวมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ต่อมาระยะที่สองอายุ 35-75 วัน เป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วอัตราการสะสมสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์สูงและรวดเร็ว ระยะนี้มีนิโคตินสะสมในใบมาก ระยะที่สามเริ่มประมาณวันที่ 61 หลังการย้ายกล้า เป็นการเข้าสู่ช่วงขยายพันธุ์ (reproductive phase) น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง (dry matter) ของใบลดลง ปริมาณนิโคตินในใบและในลำต้นลดลงอย่างรวดเร็ว มีการเคลื่อนย้ายสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์จากส่วนต่างๆ ของพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากใบไปสู่กระเปาะเมล็ด การตอนยอดทิ้งทำให้ปริมาณอัลคาลอยด์ในน้ำเซล (cell sap) เพิ่มสูงขึ้น

2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นยาสูบ

2.1.2.1 สภาพดินฟ้าอากาศ (Physical Environment)

ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ดิน แสง อุณหภูมิ ความชื้น มีผลอย่างมากต่อการเจริญเติบโต การออกดอกและกระบวนการทางชีววิทยาของต้นยาสูบ

ยาสูบมีระบบรากฝอยที่แข็งแรงและมีประสิทธิภาพ เพื่อที่จะรองรับพื้นที่ใบซึ่งสร้างขึ้นมาอย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น สภาพดินที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญเป็นอันดับแรกและปัจจัยสำคัญที่กำหนดลักษณะของดินที่เหมาะสำหรับปลูกยาสูบคือ ธาตุอาหาร น้ำและอากาศในดิน

ต้นยาสูบอาจเหี่ยวหรือตายได้เมื่อรากขาดออกซิเจน เช่น กรณีน้ำท่วม ขณะเดียวกันต้นยาสูบต้องการปริมาณน้ำเพียงพอเพื่อคงสภาพเต่ง (turgidity) ของเซลและการขยายตัวของใบ ดินปลูกยาสูบจึงต้องมีโครงสร้างโปร่ง ร่วนซุย ระบายน้ำได้ดี เพื่อให้ออกซิเจนและปริมาณน้ำในดินมีอยู่ในปริมาณพอเหมาะ เช่น ดินร่วนปนทราย ใบยาสูบที่ได้จากพื้นที่ดินดังกล่าวมักจะมีขนาดใหญ่ ใบกว้าง โครงสร้างโปร่ง การไหม้ลามดี อย่างไรก็ตามแม้จะปลูกยาสูบในสภาพดินดังกล่าว แต่ปัจจัยสำคัญอื่นๆ เช่น พันธุ์ สภาพอากาศ การใส่ปุ๋ย การเตรียมดินและการบ่มต่างกันมีความสำคัญต่อคุณภาพของใบยาแห้ง นอกจากนี้สภาพความแตกต่างของดินล่างและดินบนก็มีส่วนในการผลิตใบยาสูบให้มีคุณภาพสูง

น้ำมีความจำเป็นต่อยาสูบ พืชอวบน้ำอย่างยาสูบประกอบด้วยน้ำประมาณ 90 % ความเต่งของเซลในอวัยวะต่างๆ ขึ้นอยู่กับระดับความชื้นในดินกับความเข้มข้นของสารละลาย ความเต่งของเซลมีความสำคัญอย่างมากต่อการแผ่ขยายตัวของใบ water diffusion pressure มีผลต่อ imbibition และ hydrolysis equilibria

สภาพขาดอากาศอันเนื่องมาจากน้ำท่วมนานๆ จะทำให้เกิดรอยแผลที่รากและทำให้รากตายได้ รอยแผลอาจเป็นทางเข้าของเชื้อโรค ซึ่งจะเข้าทำลายรากอุดท่อน้ำท่ออาหารที่ฐานของลำต้นทำให้ดูเหมือนว่าสารพิษที่เกิดจากเชื้อโรคขึ้นไปทำลายยอดต้นยาสูบ จากการศึกษาโดยการทาบกิ่งให้ต้นยาสูบมีราก 2 ชุด ชุดแรกจะจมอยู่ใต้น้ำอีกชุดหนึ่งอยู่ในดินน้ำไม่ท่วม ปรากฏว่าการเจริญเติบโตของต้นยาสูบขึ้นกับรากชุดที่อยู่ในดินที่น้ำไม่ท่วม จึงสรุปได้ว่า การชะงักการเจริญเติบโตของยอดหรือของใบล่าง เกิดจากพิษที่สร้างจากรากที่จมใต้น้ำนั่นเอง (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532)

ปริมาณน้ำที่ให้กับยาสูบมีผลต่อคุณสมบัติของใบยา โดยปกติจะมีการให้น้ำกับยาสูบเตอร์กิชอย่างจำกัดเป็นผลให้ยาสูบเตอร์กิชมีขนาดใบเล็กมีน้ำมันหอมระเหยมากกว่าใบยาบ่มไอร้อนหรือใบยาบ่มอากาศ หากความชื้นในดินมีเพียงพอจะได้ใบยาที่มีนิโคติน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด CaO และ MgO ต่ำ น้ำตาลสูง การไหม้ลามดี ผลผลิตสูงและราคาดี หากความชื้นในดินมีมาก ใบยาสูบจะบาง น้ำตาลสูง สารประกอบไนโตรเจนต่ำ ในทางกลับกันหากความชื้นในดินต่ำ ทำให้สารประกอบไนโตรเจนสูงเมื่อเทียบกับคาร์โบไฮเดรต ใบยาสูบจะหนาพื้นผิวใบหยาบ

มีปริมาณของสารที่สกัดโดยปิโตรเลียมอีเธอร์ (กัม น้ำมันและเรซิน) มากและเพิ่มปริมาณการออกซิเดชันของคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรด

การปฏิบัติในไร่ เช่น ระยะปลูก อัตราปุ๋ย ความสูงต่ำของการตอนยอด ฯลฯ เป็นเพียงขั้นตอนที่ปรับให้พืชสัมพันธ์กับสภาพแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงการปฏิบัติข้อใดข้อหนึ่งเพียงเล็กน้อยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีและฟิสิกส์ของใบยาอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามสิ่งที่ชาวไร่ไม่สามารถบังคับควบคุมได้คือความแปรปรวนของสภาพแวดล้อม เช่น สภาพแห้งแล้ง ฝน ลมพายุ ลูกเห็บ เป็นต้น

ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่เป็นตัวกำหนดคุณภาพของใบยาที่สำคัญคือ ฝน การกระจายของฝนมีความสำคัญมากกว่าปริมาณ เป็นที่ทราบกันดีว่าฝนแล้งทำให้ใบยามีอัลคาลอยด์สูง น้ำตาลต่ำ และฝนตกชุกทำให้ปริมาณอัลคาลอยด์ต่ำและน้ำตาลสูง

<u>ปริมาณน้ำฝน</u>

ในปี ค.ศ. 1980 ในสหรัฐอเมริกาเป็นปีที่เกิดสภาพแห้งแล้งมีฝนตกเพียง 55 % ของปีปกติ เมื่อมีการให้น้ำเพียงอย่างเดียวสามารถเพิ่มผลผลิตได้ 20 % การใช้ประโยชน์จากใบยา 61% น้ำตาลรีดิวซ์ 55 % ขณะที่ปริมาณนิโคตินลดลง 30 % เมื่อเทียบกับพวกที่ไม่ให้น้ำ การกระจายของน้ำฝนมีความสำคัญไม่น้อยไปกว่าปริมาณน้ำฝน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและอัลคาลอยด์ทั้งหมดมีแนวโน้มต่ำลงในพื้นที่ที่ได้รับน้ำเพียงพอ (สุนทรี วรผลึก และ วิมลมาศ พวงนาค, 2527)

การที่ชาวไร่ใส่ปุ๋ยมากเกินกว่าที่กำหนดแล้วไม่ได้ให้น้ำหรือเกิดภาวะแห้งแล้ง จะทำให้ปริมาณอัลคาลอยด์ในใบเพิ่มขึ้น การให้ปุ๋ยไนโตรเจนจึงต้องควบคู่กับการให้น้ำอย่างพอเพียงด้วย จึงจะได้พื้นที่ใบหรือผลผลิตสูง ปกติต้นยาสูบตอบสนองต่อไนโตรเจนได้ไวกว่าการให้น้ำ การให้น้ำทำให้คุณภาพของใบยาสูบดีขึ้น เช่น คุณภาพการไหม้ลามเป็นต้น และมีผลทำให้องค์ประกอบไนโตรเจนลดลงบ้าง

กรณีที่เกิดสภาวะแห้งแล้งจำเป็นต้องมีการให้น้ำซึ่งสามารถจะเพิ่มผลผลิตและยกระดับคุณภาพทางเคมีของใบยาให้ดีขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระหว่างเดือนแรกของการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามการให้น้ำควรคำนึงถึงชนิดของดินประกอบกัน ดินที่มีทรายปนมากระบายน้ำดี อาจทำให้สูญเสียปุ๋ยจากการชะล้างได้ (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532)

ไร่ยาสูบที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนเกินกว่าปริมาณที่กำหนดและมีฝนทิ้งช่วง อาจได้ใบยาที่มีอัลคาลอยด์สูง ทางที่ดีควรรักษาความชื้นในดินไว้ในระดับปกติ การให้ปุ๋ยพอดีจะช่วยให้คุณภาพใบยาดีขึ้น

นอกจากนี้ผลของการให้ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณและเวลา (timing) ที่ต่างกัน ผลของความชื้นในดินและผลของการจัดการดินที่มีต่อคุณภาพของใบยาซึ่ง Weybrew (1983) อ้างถึงในปริญญา สุวงศ์วาร (2532) รายงานในงานวิจัยไว้ว่า หากความชื้นในดินสูงจะได้ใบยาที่มีสารประกอบไนโตรเจนและนิโคตินต่ำ ผลผลิตและน้ำตาลสูง คุณภาพการไหม้ลามดี ใบบาง ถ้าอยู่ในสภาพแห้งแล้งจะทำให้อัตราส่วนของสารประกอบไนโตรเจนและคาร์โบไฮเดรตสูงขึ้น ใบหนา พื้นผิวใบหยาบโดยเฉพาะอย่างยิ่งสภาวะแห้งแล้งทำให้สารประกอบไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน เพิ่มขึ้น ปริมาณของสารที่สกัดโดยปิโตรเลียมอีเธอร์ (กัม น้ำมันและเรซิน) ก็เพิ่มสูงขึ้น ระดับอิทธิพลของความชื้นในดินที่มีต่อคุณภาพใบยาขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโต ความชื้นในดินต่ำมีผลเสียสูงสุดเมื่อเกิดขึ้นในระยะที่ต้นยาสูบมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (อายุ 30-60 วัน) ภาวะแห้งแล้งในระยะท้ายๆ ของการเจริญเติบโตไม่มีผลต่อคุณภาพของใบยามากนัก

ในบรรดาการจัดการในไร่ทั้งหมดการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ไม่ถูกต้องมีผลทำให้คุณภาพลดลงมากที่สุด ยาสูบไวต่อธาตุอาหารไนโตรเจนสูงมากในทางทฤษฎีจะต้องใส่ปุ๋ยไนโตรเจนให้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตแต่ต้องไม่มากเกินไปโดยปุ๋ยไนโตรเจนต้องหมดไปพอดีกับที่ยาสูบเริ่มออกดอก

มีกระบวนการทางสรีรวิทยาที่สำคัญในพืช 2 กระบวนการเป็นตัวบ่งบอกคุณภาพของใบยาแห้ง คือ กระบวนการสร้างสารประกอบไนโตรเจนจากไนเตรท (nitrate reduction) และกระบวนการสังเคราะห์แสง(photosynthesis) ในระหว่างการเจริญเติบโตกระบวนการเมตาบอลิซึมที่เกิดในช่วงแรกๆ คือ การดูดซึม (uptake) และการใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนที่เป็นไนเตรท การดูดซึมไนเตรทขึ้นไปใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณของปุ๋ยและความชื้นในดินที่เพียงพอ การใช้ไนไตรทในการสร้างสารประกอบไนโตรเจนอาศัยเอนไซม์ไนเตรทรีดักเตส (Nitrate reductase) ซึ่งเป็นตัวทำให้ไนเตรทในเซลเพิ่มหรือลดปริมาณลงได้ ไนโตรเจนที่ได้จากการรีดักชั่นของไนเตรทถูกนำไปสร้างเป็นกรดอะมิโน โปรตีน และนิโคติน

กระบวนการสังเคราะห์แสงเป็นแหล่งของพลังงานที่ใช้ในการรีดักชันของไนเตรท ในระยะแรกๆ ของการเจริญเติบโตมีการรีดักชันของไนเตรทมากสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงเกือบทั้งหมดถูกนำไปใช้ในขบวนการรีดักชันดังกล่าวจึงมีเหลืออยู่จำนวนน้อยที่เก็บอยู่ในรูปของแป้ง หากไนเตรทในเนื้อเยื่อพร่องลงไปอาจมีสาเหตุมาจากแหล่งไนโตรเจนในดินหมดหรือยาสูบไม่สามารถดูดซึมไนโตรเจนขึ้นมาใช้ได้เนื่องจากภาวะแห้งแล้ง ซึ่งจะทำให้กระบวนการไนเตรทรีดักชันเกิดขึ้นน้อยดังนั้นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงจึงเหลือมากจึงถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นแป้งมากขึ้น

กระบวนการสะสมแป้งเป็นไปอย่างรวดเร็วมาก ความยาวของวัน (day length) เป็นตัวกำหนดปริมาณของแป้งที่สะสมในใบยา แป้งที่สะสมเต็มที่ในใบยาจะทำให้ใบยาแก่และสุกอย่างถูกต้องเหมาะสมช่วยให้นิโคตินในใบยาเจือจางลงและแป้งก็จะถูกย่อยสลายไปเป็นกลูโคสในระหว่างการบ่ม

น้ำตาลและนิโคตินเป็นองค์ประกอบของใบยาบ่มไอร้อนที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะและรสชาติของควันบุหรี่ องค์ประกอบทั้งสองมีความสัมพันธ์ทางลบต่อกัน การปฏิบัติในไร่หรือสภาพแวดล้อมที่แปรเปลี่ยนไปในทางใดก็ตามหากทำให้องค์ประกอบตัวใดตัวหนึ่งเพิ่มก็จะทำให้อีกตัวหนึ่งลดลงโดยอัตโนมัติ ซึ่งสัดส่วนที่เหมาะสมของน้ำตาลต่อนิโคตินควรมีค่าประมาณ 10 (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532) ถือเป็นค่าตัดสินคุณภาพของใบยาบ่มไอร้อนและเมื่อสัดส่วนดังกล่าวเหมาะสมแล้วก็อาจถือได้ว่าองค์ประกอบเคมีตัวอื่นๆ มีปริมาณที่เหมาะสมยอมรับได้

<u>อุณหภูมิและแสง</u>

อุณหภูมิของดินลดลงทำให้นิโคตินและฟอสฟอรัสในใบลดลง หากอุณหภูมิของดินเพิ่มขึ้นจาก 10 °C เป็น 35 °C ทำให้การดึงดูดฟอสฟอรัสมากขึ้น ยาสูบเจริญเติบโตดีที่สุดที่อุณหภูมิของดิน 22 °C ความชื้นในดิน 75 % และอุณหภูมิของอากาศ 27 °C ถ้าอุณหภูมิอากาศต่ำกว่า 13 °C ไม่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของยาสูบซึ่งจะทำให้ต้นยาสูบถึงจุดสุกแก่ (attain maturity) ช้ากว่าปกติ 10-20 วัน และหากอยู่ในสภาพอากาศเย็นคุณภาพใบยาอาจด้อยลงไป อุณหภูมิกลางคืนมีผลต่อรูปแบบของการเจริญเติบโตการออกดอกและน้ำหนักแห้ง อุณหภูมิกลางคืนต่ำเร่งการออกดอกทำให้จำนวนใบต่อต้นลดลง อัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของใบยาต่อหน่วยพื้นที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มแสงและช่วงแสงเพิ่มขึ้น อัตราส่วนของน้ำหนักสดต่อน้ำหนักแห้งของใบยาต่อหน่วยพื้นที่เพิ่มขึ้น (ความเข้มของแสงไม่มีผลต่ออัตราส่วนดังกล่าว) การสร้างสารอินทรีย์เกิดขึ้นในสภาพที่มีแสง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกละลายน้ำและมีการสะสมแป้งมากในใบยาสูบที่ได้รับแสงขณะที่พวกอยู่ในที่มืดมีจำนวนแป้งในใบลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากมีการสลายสารอินทรีย์ในที่มืด

2.1.2.2 <u>แร่ธาตุอาหารหลัก</u> (Mineral Nutrition : Primary Elements)

การเจริญเติบโตของต้นยาสูบจะเป็นไปด้วยดีหากมีธาตุอาหารอย่างพอเพียงและถูกช่วงเวลา ปกติจะใช้น้ำหนักเป็นหน่วยวัดการเจริญเติบโตของพืชการสะสมของน้ำหนักแห้งตลอดระยะเวลาการเจริญเติบโตอธิบายได้ในรูปของ sigmoid curve ผลผลิตยาสูบที่ดีได้จากการเจริญเติบโต

อย่างช้าๆ แต่มีความสม่ำเสมอ ในช่วง 7 สัปดาห์แรกของการย้ายกล้าต้นยาสูบดูดซึมไนโตรเจนขึ้นไปใช้ถึง 80% ขณะที่การใช้ฟอสฟอรัสเป็นไปอย่างสม่ำเสมอตลอดระยะเวลาของการเจริญเติบโต

ไนโตรเจน

การเคลื่อนย้าย

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของยาสูบมีผลต่อคุณภาพใบยาแห้ง การให้ปุ๋ยไนโตรเจนมีผลต่อผลผลิตและคุณภาพทางเคมีของใบยามากกว่าธาตุอาหารที่มีอยู่เดิมในดิน แสดงว่าไนโตรเจนมีการเคลื่อนย้ายได้ดีในดินยาสูบจึงดูดซึมไนโตรเจนได้ดี และไนโตรเจนเคลื่อนย้ายในต้นได้อย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน เมื่อไนโตรเจนถูกดูดซึมเข้าสู่ต้นยาสูบไม่ว่าทางรากหรือทางใบก็ตามไนโตรเจนจะถูกนำไปสร้างสารประกอบไนโตรเจนต่างๆ ภายใน 2-3 วัน ไนโตรเจนที่เข้าทางรากถูกนำไปสร้างเป็นโปรตีนที่ใบภายใน 72 ชั่วโมง ส่วนไนโตรเจนที่ใช้ฉีดพ่นทางใบยาสูบจะกระจายไปสู่ส่วนต่างๆ ทุกส่วนของลำต้นภายใน 6 ชั่วโมง ไนโตรเจนจะเคลื่อนย้ายอย่างต่อเนื่องในต้นยาสูบความเข้มข้นของไนโตรเจนเพิ่มขึ้นโดยลำดับจากโคนต้นถึงยอด เมื่อไนโตรเจนเข้าสู่ต้นมักจะเคลื่อนย้ายไปสู่บริเวณเนื้อเยื่อที่มีการเจริญเติบโตแต่ก็มีไนโตรเจนจำนวนไม่น้อยที่เคลื่อนไปสู่ใบแก่ซึ่งจะถูกนำไปสร้างเป็นโปรตีนอย่างรวดเร็ว (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532)

ผลของการให้ไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของยาสูบ

หากการขาดไนโตรเจนไม่รุนแรงมากก็ไม่มีผลต่อจำนวนใบของต้นยาสูบ ไนโตรเจนมีผลทำให้ใบขยายตัว มีขนาดใหญ่ ใบกว้าง แต่จากการทดลองของ Weybrew (1983) อ้างถึงในปริญญา สุวงศ์วาร (2532) พบว่าพื้นที่ใบยิ่งมากอัตราส่วนระหว่าง น้ำหนักต่อพื้นที่ยิ่งน้อยเนื่องจากความหนาของใบลดลง พื้นที่ใบยาสูบขึ้นอยู่กับการได้รับไนโตรเจนอย่างเพียงพอตลอดช่วงเวลาดังกล่าวจึงจะทำให้ใบขยายตัวเต็มที่ การให้ไนโตรเจนมากเกินพอจะชะลอการออกดอกและการสุกแก่เนื่องจากเป็นการยืดระยะเวลาการสร้างโปรตีนออกไป ถ้าการขาดไนโตรเจนรุนแรงมากก็มีผลอย่างเดียวกัน คือยืดระยะเวลาการสุกแก่ เพิ่มจำนวนใบและข้อใบถี่ จึงมีความจำเป็นจะต้องลดปริมาณการดูดซึมไนโตรเจนในช่วงระยะท้ายๆ ของการเจริญเติบโตเพื่อให้ต้นยาสูบเข้าสู่ภาวะการสุกแก่อย่างเหมาะสม เมื่อพื้นที่ใบขยายเต็มที่แล้วไนโตรเจนก็ไม่มีความจำเป็นอีกต่อไป น้ำเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดการใช้ไนโตรเจนของต้นยาสูบซึ่งในสภาวะที่ขาดน้ำจะทำให้ปริมาณนิโคตินในใบสูงขึ้น ผิวใบ (cuticle) หนาขึ้นเพราะเกิดสภาวะ pH ต่ำลงเนื่องจากความแห้งแล้ง ความเข้มข้นของไนโตรเจนในเนื้อเยื่อยาสูบบ่มไอร้อนมีความสัมพันธ์ทางบวกกับนิโคตินและ

สัมพันธ์ทางลบกับน้ำตาลในใบ หลังการย้ายกล้าหากขาดไนโตรเจนเร็วเท่าใดยิ่งทำให้อัตราส่วนของน้ำตาลต่อนิโคตินสูงขึ้น หากในช่วงใดช่วงหนึ่งของการเจริญเติบโตมีการขาดไนโตรเจนจะทำให้ช่วงนี้มน้ำตาลในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นและอัลคาลอยด์ลดลง

ฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสมีความจำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช สำหรับใบยาสูบที่ยังอ่อนมีฟอสฟอรัสในรูป RNA 30 % และ DNA 7 % ซึ่ง 70 % ของ RNA อยู่ใน cell sap และ 1 ใน 10 ของจำนวนนี้เกี่ยวข้องกับ microsome ฟอสฟอรัสมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง phosphorylation และกระบวนการทางชีววิทยาอื่นซึ่งเกี่ยวโยงกับ Kreb Cycle และเมตาบอลิซึมของไนโตรเจน ทำให้ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่สำคัญที่สุดธาตุหนึ่งที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช (สุนทรี วรผลึก และ วิมลมาศ พวงนาค, 2527)

พืชจะต้องได้รับฟอสเฟตอย่างพอเพียงในระยะแรกๆ ของการเจริญเติบโต ต้นยาสูบตอบสนองต่อปุ๋ยฟอสฟอรัสอย่างชัดเจนในช่วงแรกๆ ของการเจริญเติบโตมากกว่าช่วงที่ให้ผลผลิต การให้ฟอสฟอรัสมากเกินพอไม่เป็นพิษต่อต้นยาสูบแต่จะเป็นการสิ้นเปลืองต้นทุนการผลิต ผลของฟอสฟอรัสที่เด่นชัดมาก คือ ทำให้ระยะเวลาถึงจุดสุกแก่สั้นลง ในภาวะที่มีฟอสฟอรัสต่ำๆ จะยืดระยะเวลาถึงจุดสุกแก่นานออกไปและยังทำให้เกิดการหลุดร่วงของใบ ทั้งยังลดปริมาณไนโตรเจนและแมกนีเซียมในใบและทำให้สีของใบยาบ่มไอร้อนดีขึ้น ฟอสฟอรัสมีความสัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณของน้ำตาลและมีความสัมพันธ์ทางลบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

โปแตสเซียม

โปแตสเซียมมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยาสูบแต่ยังไม่ทราบบทบาทที่แน่นอนของโปแตสเซียมที่มีต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมในต้นยาสูบ โปแตสเซียมเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของเถ้า มีความจำเป็นต่อระบบเอนไซม์และมีความสำคัญในการกำหนดคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของใบยา เช่น สี พื้นผิวของใบ การเผาไหม้ สมบัติในการดูดความชื้นของใบ ปริมาณของโปแตสเซียมในใบยาสูบเบอร์เลย์อยู่ระหว่าง 2.0-3.2 % แล้วแต่พันธุ์ โปแตสเซียมสะสมในต้นยาสูบตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบ โปแตสเซียมทำให้ยาสูบมีเมล็ดมากขึ้นแต่ไม่มีผลต่อปริมาณนิโคตินในยาสูบ

แคลเซียม

โดยทั่วไปปรากฏในรูปของเกลือที่ไม่ละลายน้ำเป็นองค์ประกอบของเถ้ารองมาจากโปแตสเซียม แคลเซียมมีความจำเป็นต่อการสร้างผนังเซลเป็นตัวควบคุมระบบเมตาบอลิซึมและเป็นตัวป้องกันพิษอันเนื่องมาจากที่มีปริมาณธาตุอื่นๆ มากเกินไป การให้แคลเซียมแก่พืชอย่างเพียงพอจะช่วยให้มีปริมาณของเซลมากขึ้น การขาดแคลเซียมทำให้เกิดการสลายโปรตีนเป็นกรดอะมิโนในเซลพืชมากขึ้นหรือมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างโปรตีนนั่นเอง การขาดแคลเซียมทำให้รากชะงักการเจริญเติบโตแต่การเพิ่มแคลเซียมทำให้น้ำตาลในใบเพิ่ม

ในการให้ปุ๋ยแคลเซียม เช่น $CaCO_3$ หรือ $CaSO_3$ พบว่ายาสูบใช้ประโยชน์ของแคลเซียมจากปุ๋ยเหล่านี้เพียง 2-6 % แม้ว่าจะกำลังเกิดภาวะขาดแคลเซียมในดินอยู่ก็ตาม แคลเซียมไม่ถือเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น (Essential nutrient) สำหรับยาสูบแต่เป็นตัวรักษาระดับ pH ในดินให้เหมาะสม

2.1.2.3 ธาตุอาหารรอง (Mineral Nutrition : Micro and Secondary Elements)

ธาตุอาหารรองหลายตัวมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยาสูบ แต่ยังไม่มีเอกสารใดชี้ถึงหน้าที่โดยตรงของธาตุเหล่านี้ในต้นยาสูบ ยาสูบเป็นพืชที่ปลูกอยู่ทั่วโลกภายใต้สภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันของดิน สภาพภูมิอากาศ และการปฏิบัติในไร่ การใช้ปุ๋ยหรือการปฏิบัติใดๆ เกี่ยวกับธาตุอาหารรองเหล่านี้ต้องเปลี่ยนไปตามสถานการณ์ (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532)

โบรอน เป็นธาตุอาหารจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของยาสูบ เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของโปรตีน การสร้างอัลคาลอยด์ การเคลื่อนย้ายธาตุอาหารในพืช และยังกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต

คลอรีน ปริมาณคลอรีนน้อยๆ (2 % ในปุ๋ย) จะทำให้คุณภาพของใบยาแห้งดีขึ้นในแง่ของสี ความชื้น ความยืดหยุ่น การเผาไหม้ และการคงคุณภาพของใบยาแห้ง หากคลอรีนมากเกินไปจะทำให้การไหม้ลามไม่ดี คลอรีนในใบมีมากทำให้ความชื้นในใบสูงขึ้นเป็นผลให้สมบัติ fire holding capacity ลดลง แต่คลอรีนไม่มีผลต่อปริมาณนิโคติน

กำมะถัน ยาสูบแสดงอาการขาดกำมะถันที่ใบยอดมีสีเหลือง เมื่อนำไปบ่มจะได้ใบยาสีซีดจาง

แมกนีเซียม อาการเหลืองของยาสูบ ซึ่งเกี่ยวข้องกับเม็ดสีเขียวและเหลืองของคลอโรฟิลมีผลมาจากการขาดแมกนีเซียม ปกติมักไม่มีการขาดแมกนีเซียมเนื่องจากมีการใช้ปุ๋ยที่มีแมกนีเซียมอยู่เพียงเล็กน้อยก็เพียงพอต่อความต้องการของยาสูบ การให้ MgO ในรูปของปุ๋ยจะ

เพิ่มคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำลดปริมาณนิโคตินในใบยาและคุณภาพการเผาไหม้ลดลงเนื่องจาก MgO ไปลดการดึงดูดโปแตสเซียมจากดิน ปริมาณแมกนีเซียมในพืชยังขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝนในช่วงฤดูเพาะปลูกหากฝนมากก็จะทำให้พืชขาดแมกนีเซียมได้ง่ายขึ้น

แมงกานีส ยาสูบแสดงอาการขาดจะมีอาการขาดคลอโรฟิลเกิดเป็นสีเหลืองระหว่างเส้นใบ ทำให้ดูเหมือนร่างแห ต่อมาอาจมีจุดตายบนใบเป็นจุดสีขาวหรือออกสีน้ำตาล อาการเหลืองดังกล่าวจะหายไปหากได้รับแมงกานีสเพียงพอในระยะหลัง การใช้ปูนขาวทำให้แมงกานีสละลายได้น้อยลงซึ่งยาสูบนำไปใช้ได้น้อย หากแมงกานีสมากเกินไปจะได้เถ้ายาสูบมีสีคล้ำคล้ายโคลน การควบคุมปริมาณของแมงกานีสในใบยาอาจทำได้ด้วยการควบคุม pH ของดินให้เกิน 5.0 อยู่เสมอ

2.1.3 คุณภาพของใบยาสูบ

คุณภาพของใบยาสูบขึ้นอยู่กับสารประกอบที่สำคัญดังต่อไปนี้ คือ

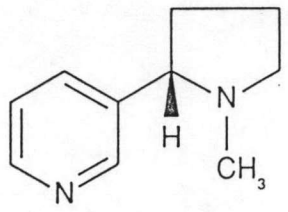
2.1.3.1 สารประกอบไนโตรเจน

สารประกอบไนโตรเจนมีความสัมพันธ์กับคุณภาพใบยาในทางกลิ่นรส เมื่อเผาไหม้ให้ควันเป็นด่าง ถ้ามีปริมาณมากเกินไปรสจะฉุนแรงแต่ถ้าปริมาณน้อยไปควันบุหรี่จะจืดชืดไม่มีรสชาติขาดความชวนสูบ

สารประกอบไนโตรเจนในใบยา แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (สุนทรี วรผลึก และวิมลมาศ พวงนาค, 2527) ดังนี้

1. โปรตีน เป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ ในระหว่างการบ่มใบยาจะถูกไฮโดรไลซ์ เป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ซึ่งมีโมเลกุลเล็กลง เช่น โพรลีน แอสพาราจีน กลูตามีน กรดแอสพาติค และกรดกลูตามิค ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยารวมตัวกับน้ำตาลรีดิวซ์ในใบยาให้สารระเหยเกิดขึ้นในขั้นตอนการเก็บให้ได้อายุ (Maillard reaction) ฉะนั้นใบยาที่คุณภาพดีปริมาณโปรตีนและไนโตรเจนที่เหลืออยู่ภายหลังการบ่มแล้ว ไม่ควรมีมากเกินไป

2. อัลคาลอยด์ (Alkaloids) ในใบยาสูบมีหลายชนิด อัลคาลอยด์ในยาสูบส่วนใหญ่เป็นอนุพันธ์ของ 3-pyridyl ส่วนใหญ่คือ นิโคติน ($C_{10}H_{14}N_2$) ซึ่งมีอยู่ถึง 90 % ของอัลคาลอยด์ทั้งหมด ส่วนน้อยเป็นนอร์นิโคติน (nornicotine) แอนาเบซิน (anabasine) แอนาตาบีน (anatabine) และอื่นๆ นิโคตินถูกสร้างขึ้นที่รากและส่งไปสะสมอยู่ที่ใบ ในโมเลกุลของนิโคตินมีไนโตรเจนอยู่ 13 % ปริมาณนิโคตินแตกต่างกันตามประเภทของใบยา พันธุ์เบอร์เลย์มีสูงที่สุด เวอร์ยิเนียปานกลาง และใบยาเตอร์กิชน้อยที่สุด



(*S*)-Nicotine

รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของนิโคติน

นิโคตินมีอยู่ในใบมากที่สุดรากมีน้อยลำต้นมีน้อยที่สุด ในแต่ละใบที่ปลายใบและขอบใบด้านนอกมีนิโคตินสูงกว่าบริเวณฐานใบและบริเวณเนื้อใบด้านในตามลำดับ ปริมาณอัลคาลอยด์เพิ่มขึ้นเมื่อถึงจุดสุกแก่ โดยเฉพาะช่วงหลังการตอนยอดเมื่อใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มจะทำให้ปริมาณนิโคตินเพิ่มขึ้นด้วย ยาสูบสร้างนิโคตินจากไนโตรเจนทั้งที่ดูดขึ้นไปก่อนและหลังการตอนยอด ไนโตรเจนที่ดูดขึ้นไปหลังการตอนยอดถูกนำไปสร้างนิโคตินได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าไนโตรเจนที่ดูดขึ้นไปก่อนการตอนยอด ดังนั้นหากต้องการนิโคตินต่ำต้องไม่ให้ไนโตรเจนมากเกินไปและไม่ให้ไนโตรเจนหลังการตอนยอด

ในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโตยาสูบมีจุดสมดุลของระบบเมตาบอลิซึมอยู่จุดหนึ่ง การเพิ่มไนโตรเจนหรือสารใดๆ ให้กับยาสูบจะทำให้สมดุลของระบบเปลี่ยนไปในทางที่ต้องการหรือไม่ต้องการก็ได้ ไนโตรเจนที่ให้กับยาสูบนอกจากนำไปสร้างนิโคตินแล้วยังนำไปสร้างเป็นสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนจุดสมดุลของคาร์บอน-ไนโตรเจน

ปัจจัยที่ควบคุมระดับนิโคตินของต้นยาสูบมีหลายประการ เช่น พันธุ์ ธาตุอาหาร โดยเฉพาะไนโตรเจน ความสมบูรณ์ของราก ปราศจากโรค ระยะการตอนยอด ความชื้นในดิน ระดับความแก่สุกของใบยา ตำแหน่งของใบยาบนลำต้น การเว้นระยะปลูก การพรวนดิน การถ่ายเทอากาศในดิน ความลึกของดิน ผลผลิตต่อไร่ แสงสว่างและอุณหภูมิ เป็นต้น

2.1.3.2 สารประกอบคาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรต เป็นองค์ประกอบที่มีมากที่สุดในใบยา คือ ในใบยาแก่มีประมาณ 25-50% ของน้ำหนักใบยาแห้ง อัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตรูปต่างๆ แตกต่างกันตามประเภทของใบยา โดยทั่วไปยาบ่มไอร้อนมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดสูง

คาร์บอนไดออกไซด์ที่พืชใช้ในภาวะปกติร้อยละ 75 จะเปลี่ยนไปเป็นโพลีแซคคาไรด์ พืชจะนำคาร์โบไฮเดรตไปสร้างเป็นโครงสร้างของพืช เช่น เซลลูโลส ลิกนิน เพ็คติน แป้ง เกลือ-

โพลีแซคคาไรด์ที่มีลักษณะคล้ายกัม เป็นต้น เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลและระบบท่อน้ำท่ออาหารโดยมีเกลือแคลเซียมของกรดเพคติกเป็นตัวเชื่อมผนังเซลเข้าด้วยกัน

ในต้นยาสูบที่กำลังเจริญเติบโตคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกนำไปสร้างเป็นโพลีแซคคาไรด์แล้วถูกย่อยให้เป็น ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ตามลำดับด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส

2.1.3.3 แร่ธาตุต่างๆ ในใบยา

แร่ธาตุต่างๆ ที่มีอยู่ในใบยาสูบ แบ่งออกเป็น 3 ประเภท (ปริญญา สุวงศ์วาร, 2532) ดังนี้

1 ธาตุอาหารหลัก ต้นยาสูบต้องการเป็นจำนวนมาก ได้แก่ ไนโตรเจนฟอสฟอรัส โปรแตสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม และกำมะถัน

2 ธาตุอาหารรอง ต้นยาสูบต้องการเป็นจำนวนน้อย ได้แก่ อะลูมิเนียม โบรอน คลอรีน ทองแดง เหล็ก แมงกานีส โมลิบดินัม โซเดียม ซิลิกอนและสังกะสี

3 ธาตุอาหารโครงสร้าง ได้แก่ คาร์บอน ออกซิเจน และไฮโดรเจน

ธาตุอาหารต่างๆ เหล่านี้จำเป็นต้องใช้สำหรับการเจริญเติบโต บางธาตุมีความสัมพันธ์กับสมบัติการเผาไหม้ของใบยาด้วย

2.2 โปรตีนพืช

โปรตีนเป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วยหน่วยเล็กๆ ที่เรียกว่า "กรดอะมิโน" เชื่อมต่อกัน พบได้ในพืชและสัตว์ทั่วไปโดยจะเป็นองค์ประกอบหลักในโปรโตพลาสซึมของสิ่งมีชีวิต เมื่อมนุษย์รับประทานพืชและสัตว์ก็จะได้รับกรดอะมิโนไปใช้ในกระบวนการต่างๆ ไม่ว่าโปรตีนจะมาจากแหล่งใดก็ตามจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 18-20 ชนิด เพียงแต่โปรตีนแต่ละชนิดมีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ไม่เท่ากัน โปรตีนจากแหล่งต่างๆ จึงมีสมบัติและคุณภาพไม่เหมือนกัน (Fennema, 1996)

กรดอะมิโนเกือบทั้งหมดมีกลุ่มอะมิโนอยู่ในตำแหน่งแอลฟา จึงเรียกกรดอะมิโนเหล่านี้ว่า "α-amino carboxylic acids" ซึ่งมีเพียงกรดอะมิโนโปรลีนและไฮดรอกซีโปรลีนเท่านั้นที่อยู่ในรูป α-imino acid เมื่อกลุ่มคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวที่หนึ่งจะเชื่อมต่อกับกลุ่มอะมิโนของกรดอะมิโนตัวที่สองทำให้เกิดโมเลกุลยาวโดยมีพันธะที่เกิดขึ้นเรียกว่า "พันธะเปปไทด์" (peptide bond) และสารที่เกิดขึ้นเรียกว่า "สารเปปไทด์" (peptide) ถ้าสารที่เกิดขึ้นมีกรดอะมิโนเพียง 2 ตัว จะเรียกว่า "ไดเปปไทด์" (dipeptides) และถ้าสารที่เกิดขึ้นมีกรดอะมิโนหลายตัวจะเรียกว่า "โพลี-

เปปไทด์" (polypeptides) กรดอะมิโนที่ประกอบกันเป็นโปรตีนนั้นอาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยถือโครงสร้างของโมเลกุลเป็นเกณฑ์ (Pomeraz, 1991) คือ

aliphatic amino acids ได้แก่ glycine (Gly) alanine (Ala) valine (Val) leucine (Leu) isoleucine (Ile) serine (Ser) Threonine (Thr) cysteine (Cys) methionine (Met) aspartic acid (Asp) asparagine (Asn) glutamic acid (Glu) glutamine (Gln) arginine (Arg) lysine (Lys)

aromatic amino acids ได้แก่ phenylalanine (Phe) tyrosine (Tyr) tryptophan (Trp)

heterocyclic aliphatic amino acids ได้แก่ histidine (His) proline (Pro) hydroxyproline (Hyp)

โครงสร้างของโปรตีนสามารถแบ่งได้ 4 ระดับ (บุญยืน สาริกะภูติ, 2522)

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (Primary structure) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่บอกให้ทราบว่าโปรตีนนั้นมีกรดอะมิโนกี่ตัวเป็นองค์ประกอบ แสดงการเรียงลำดับของกรดอะมิโนว่ากรดตัวใดอยู่ที่ตำแหน่งใดและแสดงว่ากรดอะมิโนเหล่านั้นจับกันด้วยพันธะเปปไทด์ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ที่สำคัญและจะเป็นส่วนที่เรียกว่า back bone

2. โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) เป็นโครงสร้างที่แสดงให้ทราบว่าสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide chain) นั้นไม่ได้อยู่เป็นเส้นตรงแต่จะขดเป็นเกลียวแบบอัลฟาเฮลิกซ์ และมีพันธะไฮโดรเจนยึดเหนี่ยวระหว่างหมู่คาร์บอนิลกับหมู่อิมิโนของพันธะเปปไทด์นั้น

3. โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) เป็นโครงสร้างที่แสดงให้เห็นว่า สายโพลี-เปปไทด์นั้นขดพับและจับกระชับกันแน่นเป็นก้อนกลมด้วยพันธะไดเปปไทด์ และพันธะที่มีแรงอ่อนๆ

4. โครงสร้างจตุรภูมิ (Quaternary structure) เป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยสายโพลี-เปปไทด์หลายสายรวมกัน

การสูญเสียสภาพของโปรตีนจะเป็นการเปลี่ยนโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ของโปรตีนโดยโมเลกุลของโปรตีนคลายเกลียวออกไม่ขดพับดังเดิม แต่พันธะเปปไทด์ยังคงอยู่โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนเกี่ยวข้องกับพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโพลีเปปไทด์ แรงดึงดูดระหว่างหมู่ที่มีขั้วและไม่มีขั้วและพันธะไดซัลไฟด์ โปรตีนจะมีรูปร่างอย่างไรขึ้นอยู่กับพันธะและแรงดึงดูดเหล่านี้ เมื่อพันธะเหล่านี้ถูกทำลายรูปร่างของโปรตีนย่อมเปลี่ยนไป (บุญยืน สาริกะภูติ, 2522)

โปรตีนพืชเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์ โดยส่วนหนึ่งนำมาใช้ในรูปของวัตถุดิบสำหรับการประกอบอาหาร อีกส่วนหนึ่งได้ถูกสกัดออกมาในรูปของโปรตีนเข้มข้น (protein concentrates) โปรตีนบริสุทธิ์สูง (protein isolates) กรดอะมิโน และอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับโภชนาการ เช่น เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ ให้กลิ่นรส ทำให้อาหารเกิดโฟม เป็นต้น ถึงแม้โปรตีนชนิดนี้จะเป็นที่รู้จักและใช้เป็นอาหารมานาน แต่การผลิตโปรตีนเข้มข้นหรือโปรตีนบริสุทธิ์สูงก็เริ่มไม่นานมานี้ ในบรรดาโปรตีนที่มนุษย์ผลิตได้ประมาณ 4 ใน 5 มาจากพืช มีเพียง 1 ใน 5 เท่านั้นที่มาจากสัตว์ ส่วนที่มาจากพืชนั้นประมาณ 2 ใน 3 มาจากธัญพืช และ 1 ใน 5 มาจากเมล็ดพืชน้ำมัน โดยทั่วไปแล้วโปรตีนจากพืชมีคุณภาพต่ำกว่าโปรตีนจากสัตว์ การนำโปรตีนหลายชนิดมาผสมกันก่อนการบริโภคจะทำให้คุณภาพของโปรตีนดีขึ้น (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2538)

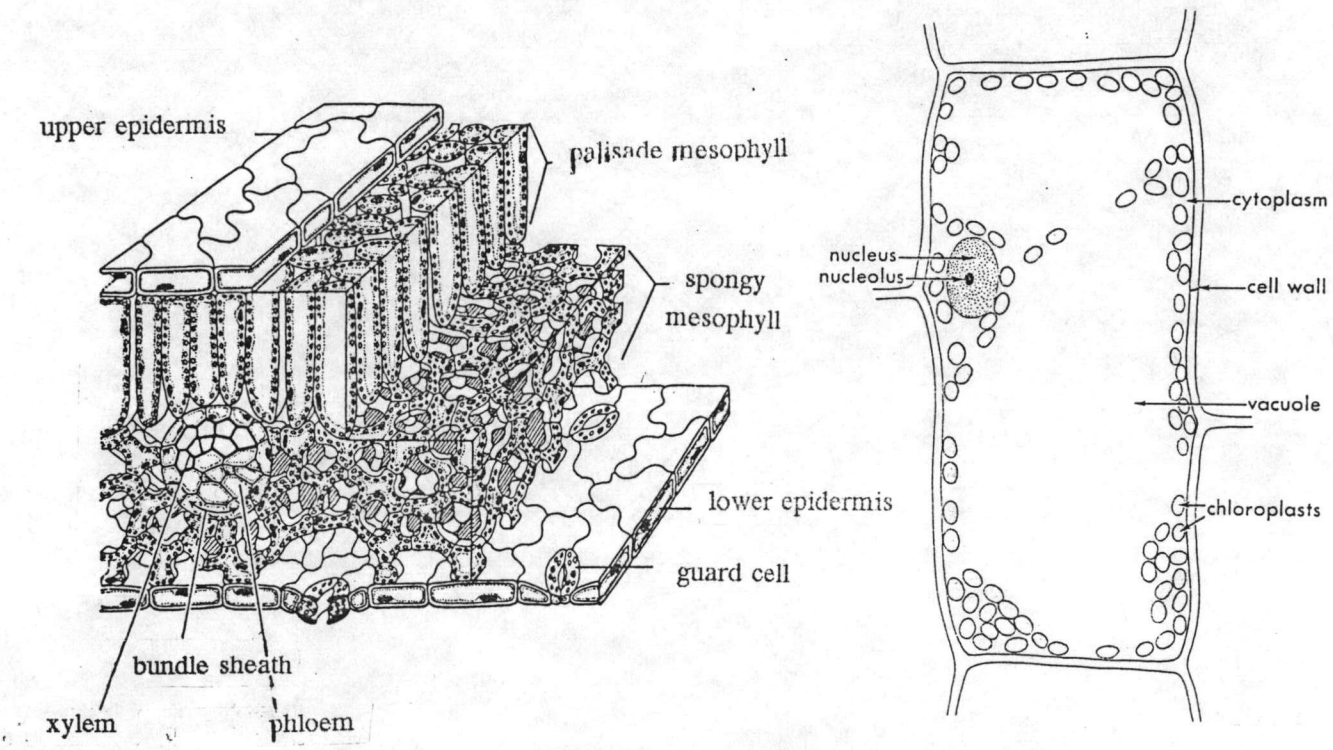
พืชใบเขียวเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีมากและมีราคาถูกที่สุดเพราะสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนได้อย่างไม่จำกัดจากสารเริ่มต้นที่มีอยู่อย่างมากมายในธรรมชาติคือพลังงานจากแสงแดด คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และไนโตรเจน (ซึ่งอาจอยู่ในรูปของแร่ธาตุอนินทรีย์หรือไนโตรเจนจากบรรยากาศในกรณีของพืชตระกูลถั่ว) กรดอะมิโนที่สังเคราะห์ได้จะถูกโพลีเมอไรซ์ให้อยู่ในรูปโปรตีนที่ใหญ่ขึ้น และเก็บสะสมไว้ในใบไม้ ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นในระยะแรกที่พืชแตกใบ เมื่อพืชออกดอกโปรตีนจะถูกไฮโดรไลส์ให้เป็นกรดอะมิโนและถูกส่งออกจากใบผ่านทางลำต้นไปสร้างดอก การสังเคราะห์โปรตีนในใบยังคงดำเนินต่อไป ในขณะเดียวกันก็จะมีโปรตีนบางส่วนถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นกรดอะมิโน แต่เมื่ออัตราการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไปเป็นกรดอะมิโนมากกว่าอัตราการสังเคราะห์แล้ว ในที่สุดกระบวนการทั้งสองนี้จะหยุดช่วงนี้จะเป็นระยะเดียวกันกับที่โปรตีนและแป้งถูกนำไปสะสมในเมล็ดพร้อมกับใบเขียวเปลี่ยนเป็นเหลืองซึ่งปริมาณโปรตีนในใบจะต่ำลง (Oke, 1973)

โดยทั่วไปลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบต่างๆ ของใบพืชจะประกอบด้วยชั้นต่างๆ 7 ชั้น ดังรูปที่ 2.2 ได้แก่ ชั้น upper epidermis ต่อด้วย palisade mesophyll 2 ชั้น และ spongy mesophyll 3 ชั้นส่วนชั้นล่างสุดจะเป็น lower epidermis โดยชั้น palisade mesophyll ที่ติดกับ spongy mesophyll จะแยกกันไม่ชัดเจนนัก (Fahn, 1989) ซึ่งในใบพืชจะประกอบด้วยเซลมากมายหลายชนิดซึ่งเซลเหล่านี้จะมีองค์ประกอบพื้นฐานที่เหมือนกันคือ ส่วนที่มีชีวิตเรียกว่าโปรโตพลาสซึม (protoplasm) กับส่วนที่ไม่มีชีวิตที่ล้อมรอบหรือหุ้มเซลอยู่ในพืชจะหนาและเห็นได้ชัดเจนเรียกว่าผนังเซล โปรโตพลาสซึม อาจแบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ นิวเคลียส (nucleus) กับไซโตพลาสซึม (cytoplasm) โดยมีเยื่อหุ้มนิวเคลียสกั้นอยู่ ส่วนผนังเซล ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนประกอบของเส้นใยและยังมีสารพิเศษเคลือบผนังเซลหรือแทรกในระหว่างเส้นใยได้แก่ ลิกนิน (lignin) ซูเบอริน(suberin) และไข (wax)

ไซโตพลาสซึมจะประกอบด้วยโครงสร้างจำนวนมากเรียกว่า organell เช่นไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ทำหน้าที่เป็นแหล่งเกิดปฏิกิริยาที่ให้พลังงานในกระบวนการหายใจ (respiration) พลาสติด (plastid) เป็นกลุ่ม organell ที่มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น มีหลายชนิด ได้แก่

- คลอโรพลาส (chloroplast) มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง
- โครโมพลาส (chromoplast) มีสีอื่นๆ ยกเว้นสีเขียว
- ลิวโคพลาส (leucoplast) จะไม่มีสี ทำหน้าที่สะสมอาหารต่างๆ ถ้าสะสมแป้งมากเรียก amyloplast สะสมไขมันมากเรียกว่า lipoplast ถ้าสะสมโปรตีนมากเรียกว่า proteinoplast

หน้าที่หลักของใบไม้คือการสังเคราะห์แสงและการสังเคราะห์สารชีวเคมีต่างๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เป็นต้น ในเซลพืช 1 เซลจะประกอบไปด้วย นิวเคลียส 1 หน่วย มีคลอโรพลาสมากมาย (มากกว่า 100 หน่วย ต่อ 1 เซล) และจะมีน้ำ 60 - 80 % ของปริมาตรของเซล โปรตีนที่อยู่ในเซลพืชจะอยู่ในส่วนของไซโตพลาสซึมถึง 95 % (Kohler และ Lyon, 1977)



รูปที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆ ในใบพืช

ที่มา : Fahn (1989)

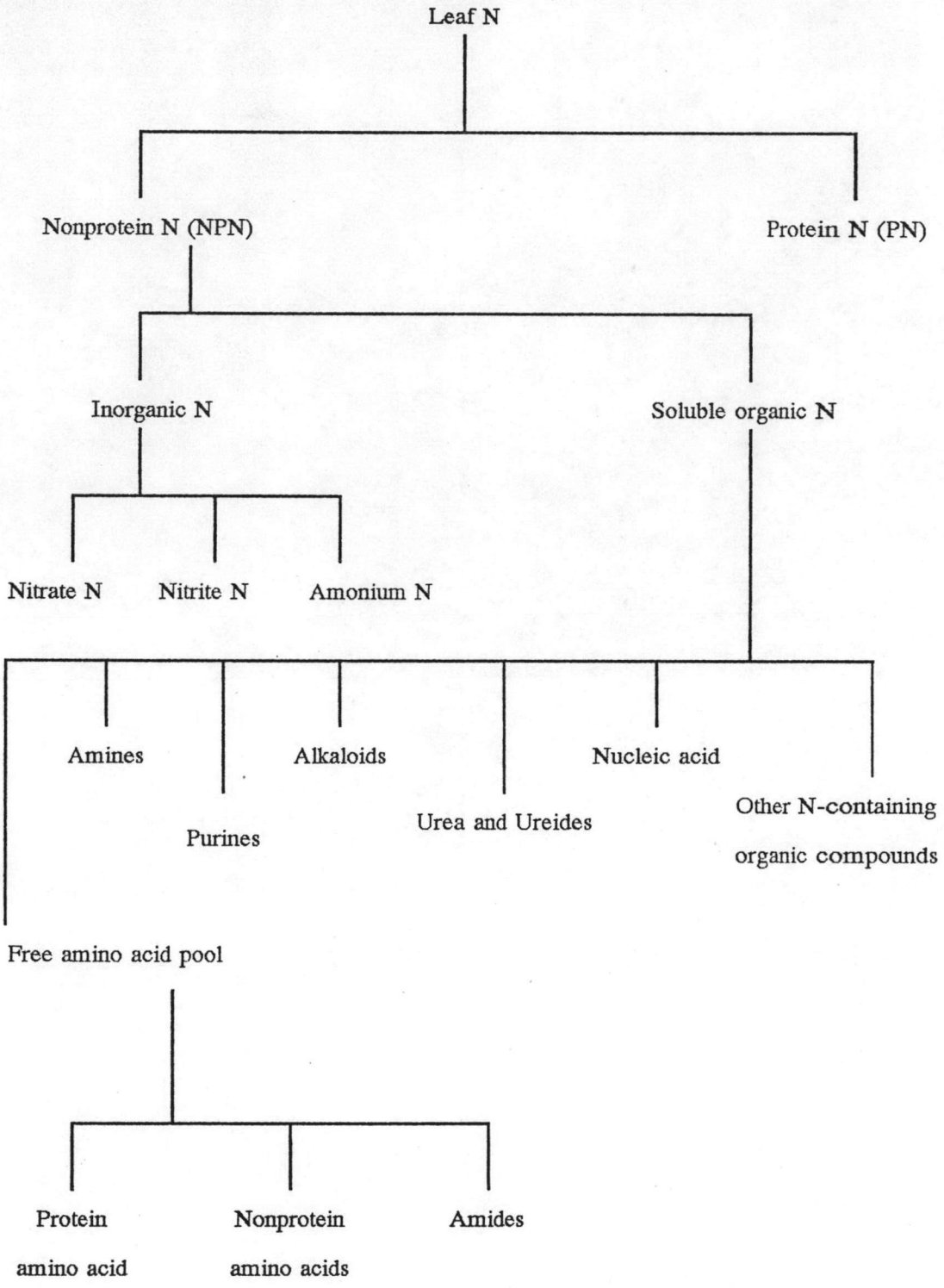
เยื่อหุ้มเซลชั้นนอกของไซโตพลาสซึมจะควบคุมความเต่งของเซลเมื่อให้ความร้อน 60 ถึง 80 °C โปรตีนจะถูกทำลายไปส่งผลให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติความสามารถในการละลายลดลงทำให้โปรตีนตกค้างอยู่ภายในเซล ดังนั้นในการสกัดโปรตีนจากใบพืชจึงไม่ควรใช้ความร้อนในขั้นตอนการสกัดโปรตีนออกจากเซลแต่ควรใช้วิธีทำให้เซลแตกทางเชิงกลซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีซึ่งจะมีขั้นตอนและรายละเอียดแตกต่างกันไป วิธีที่นิยมคือการใช้เครื่องมือกลบดและบีบอัดให้เซลแตกแยกเอาสารละลายออกมาจากส่วนกาก (Knuckles และ Kohler , 1982; De Jong และ Sounders, 1986) หรืออีกวิธีคือการปั่นให้เซลพืชละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นละเอียด (blender) ซึ่งจะต้องใช้สารสกัดด้วยเพื่อให้โปรตีนละลายออกมาอยู่ในสารละลาย (Wang และ Kinsella, 1975; Sheen และ Sheen, 1986)

การสกัดโปรตีนจากเซลจะทำให้เอนไซม์ต่างๆ จะจับกับ substrate ซึ่งจะทำให้เกิดปัญหาที่สำคัญ คือการที่สูญเสียโปรตีนไปเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ protease เป็นต้น (Knuckles, Kohler และ De Fremery, 1979) ซึ่งสามารถยับยั้งปฏิกิริยาเหล่านี้ได้โดยการปรับ pH ให้สูงกว่า 8.0 หรือโดยการแช่เย็นทันทีหลังจากการเก็บเกี่ยวหรือหลังจากการสกัดโปรตีน (Telek และ Graham, 1983)

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีในใบพืชไม่ใช่เป็นโปรตีนทั้งหมด แต่จะมีการกระจายไปอยู่ในรูปของสารประกอบไนโตรเจนต่างๆ ดังรูปที่ 2.3 นอกจากนี้การกระจายของไนโตรเจนจะขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของพืชด้วย เช่น อายุ ปริมาณสารอาหารที่ได้รับ สภาวะการปลูกเป็นต้น ตัวอย่างใบพืชที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ไนโตรเจนที่อยู่ในส่วนของใบจะถูกเคลื่อนย้ายออกไปจากใบ เนื่องจากโปรตีนและกรดอะมิโนจะเริ่มเสื่อมสลายไปเมื่อใบเริ่มแก่ นอกจากนี้การให้ปุ๋ยไนโตรเจนในรูปของสารประกอบไนเตรตนั้นจะมีส่วนเพิ่มปริมาณ non-protein nitrogen เนื่องจากพืชจะสะสมอยู่ในรูปของไนเตรตนั่นเอง

โปรตีนในใบพืชจะไม่เหมือนโปรตีนที่สะสมอยู่ในเมล็ดพืช โปรตีนที่สะสมอยู่ในใบส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของเอนไซม์ซึ่งสามารถเรียกได้ว่าเป็นโปรตีนที่มีมากที่สุดในโลก สามารถแยกออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ fraction 1 protein (F1P) ส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนของไซโตพลาสต์และคลอโรพลาสต์บางส่วน และ fraction 2 protein (F2P) ซึ่งจะอยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์ (Byers, 1983)

สารประกอบต่างๆ ในใบพืชจะเพิ่มขึ้นโดยขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงของเอนไซม์ ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase การที่พืชมีน้ำหนักแห้ง (dry matter) มากไม่ได้หมายความว่าจะมีปริมาณโปรตีนอยู่สูง ทั้งนี้เพราะพืชบางชนิด เช่น ข้าวโพดและอ้อยจะมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงเพื่อผลิตเป็นคาร์โบไฮเดรตมากกว่าโปรตีน (Ellis, 1978)



รูปที่ 2.3 ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปต่างๆในใบพืช

ที่มา:Byers (1983)

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ถึงแม้จะเป็นตัวบ่งบอกปริมาณโปรตีนที่ดีแต่ก็ไม่ใช่เสมอไป เพราะพืชบางชนิดเช่น กะหล่ำปลีจะมี non-protein nitrogen อยู่ถึง 50 % โดยทั่วไปแล้วพืชส่วนมาก 50-70 %ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจะเป็นโปรตีน (protein nitrogen) (Byers, 1983)

ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการสกัดโปรตีนจากใบพืชที่สำคัญ (Ellis, 1978) คือ

1. ไนโตรเจน 70 - 75 % ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในใบจะเป็นโปรตีนที่แท้จริงและจะมี non-protein nitrogen อยู่ 25 -30 % ซึ่งในส่วนนี้ 60 % จะอยู่ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ
2. ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จะมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับจำนวนเซลที่ถูกทำให้แตกและปริมาณโปรตีนที่ละลายออกมาได้
3. ในขั้นตอนการแยกสารละลายโปรตีนออกจากกากซึ่งจะมีส่วนของเส้นใยอยู่มากเส้นใยนี้จะไปดูดสารละลายโปรตีนไว้ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนลดลง

2.3 <u>โปรตีนเข้มข้นจากใบพืช</u>

โปรตีนเข้มข้นจากใบพืช (Leaf Protein Concentrates, LPC) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากใบพืช โดยการทำให้เซลพืชแตกเพื่อสกัดโปรตีนออกมาแยกเอากากออกจะได้ green juice แยกส่วนของ green juice ต่อไปโดยการตกตะกอนโปรตีน แยกตะกอนโปรตีนออกจะได้โปรตีนเข้มข้นจากใบไม้ (LPC) และเหลือ brown juice (ส่วนนี้อาจเรียกว่า whey) (Byers, 1983) และเมื่อนำส่วน brown juice มาตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีต่างๆ อีกครั้งจะได้ส่วนที่เรียกว่า fraction 1 protein (Pirie, 1971; Bestchart, 1974; Knuckles และคณะ, 1979)

วิธีการตกตะกอนโปรตีนมีหลายวิธี เช่น การใช้ความร้อน การทำให้เป็นกรด การเติมเกลือ การเติมตัวทำละลาย อุลตราฟิวเตรชัน และ diafiltration เป็นต้น ถ้าตกตะกอนโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างกัน จะได้โปรตีนเข้มข้นจากใบพืชสองชนิดคือ โปรตีนเข้มข้นจากใบพืชชนิดคลอโรพลาสติก (Chloroplastic LPC) ซึ่งมีสีเขียวเมื่อใช้อุณหภูมิ 45-60 °C และเมื่อนำ brown juice มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C จะได้ โปรตีนเข้มข้นจากใบพืชชนิดไซโตพลาสมิก (cytoplasmic LPC) ซึ่งมีสีขาว (Pirie, 1971)

โปรตีนเข้มข้นจากใบพืชโดยทั่วไปจะประกอบด้วยโปรตีน 50-60 % ไขมัน 20-25 % คาร์โบไฮเดรต 10-15 % และที่เหลือเป็นเถ้า โปรตีนเข้มข้นจากใบพืชชนิดไซโตพลาสมิกจะประกอบด้วยเอนไซม์ของพืชเป็นส่วนใหญ่และมีปริมาณโปรตีนประมาณ 85-95 % ซึ่งใกล้เคียงกับโปรตีนบริสุทธิ์ ส่วนโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชชนิดคลอโรพลาสติกจะมีโปรตีนน้อยกว่า 50 % (Byers, 1983)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากใบพืช

ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อของใบพืชจะสามารถสกัดออกมาได้ปริมาณมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายประการ (เยาวลักษณ์ สุรพันธ์พิศิษฎ์, 2518; Pirie, 1971; Telek และ Graham, 1983) ได้แก่

2.4.1 ชนิดและพันธุ์ของพืช

พืชแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์จะมีองค์ประกอบและสมบัติแตกต่างกันไป ดังนั้นการนำพืชชนิดใดมาสกัดเพื่อผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชต้องคำนึงถึงองค์ประกอบและสมบัติต่างๆ ด้วยเพื่อให้ได้โปรตีนเข้มข้นจากใบพืชที่มีคุณภาพและตรงตามความต้องการ

สมบัติที่ต้องคำนึงถึง คือ

- ปริมาณสารประกอบและน้ำหนักแห้ง (dry matter) ในใบพืช
- ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในใบพืช
- ความสามารถในการสกัดได้ของโปรตีนในใบพืช
- ปริมาณโปรตีนที่ได้ในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย
- สารต่อต้านคุณค่าทางอาหารและความเป็นพิษ

สมบัติข้อสุดท้ายคือสารต่อต้านคุณค่าทางอาหารและความเป็นพิษ เป็นสมบัติที่สำคัญมากในการที่จะคัดเลือกพืชมาสกัดโปรตีนจะต้องพยายามหลีกเลี่ยงสารต่อต้านคุณค่าทางอาหารและความเป็นพิษนี้ (เยาวลักษณ์ สุรพันธ์พิศิษฎ์, 2518)

พืชแต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันแม้ในชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันจะมีปริมาณแตกต่างกันไป ความสามารถในการสกัดโปรตีนในใบพืชจะขึ้นอยู่กับว่า ถ้าพืชมีลักษณะแห้งและมีเส้นใยมากอันเนื่องมาจากการเจริญที่ไม่ดีหรือมีอายุมากจะทำให้สกัดโปรตีนได้ยาก พืชบางชนิดการสกัดโปรตีนทำได้ไม่ดีเพราะว่า ของเหลวที่อยู่ในเซลพืช เช่น เมือก ซึ่งจะมีผลในการป้องกันการแยกตัวของของเหลวจากเส้นใยหรือของเหลวที่อยู่ในเซลนั้นมีความเป็นกรด หรือมี phenolic compound มาก ซึ่งจะมีผลทำให้โปรตีนตกตะกอนในเนื้อเยื่อทำให้ยากแก่การแยก

โปรตีนออกมา การตกตะกอนบางส่วนของโปรตีนเกิดได้ง่ายเนื่องจากโปรตีนชนิดคลอโรพลาสติก (chloroplastic protein) ไม่มีความเสถียรและความล่าช้าในการสกัดจะทำให้โปรตีนสูญสลายไปด้วย (Arkcoll และ Festenstein, 1971)

2.4.2 <u>ส่วนของพืชที่นำมาสกัด</u>

ส่วนต่าง ๆ ของพืชได้แก่ ลำต้น ก้านใบ และใบ จะมีองค์ประกอบต่าง ๆ แตกต่างกันไป โดยเฉพาะปริมาณโปรตีน ในปี ค.ศ. 1978 Walter, Purcell และ McCollum ได้ศึกษาการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากใบ Jewel sweet potato จากส่วนของใบ ก้านใบและลำต้นเปรียบเทียบกัน พบว่าควรจะใช้ส่วนของใบเท่านั้นมาสกัดโปรตีนเพราะจะให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่าที่ได้จากลำต้นถึง 3 เท่า และในส่วนของก้านใบจะมีโปรตีนคิดเป็น 12-17 % ของโปรตีนในใบเท่านั้น ซึ่งงานวิจัยนี้แนะนำว่าการเก็บเกี่ยวเพื่อนำมาผลิตเป็นโปรตีนเข้มข้นในปริมาณมากๆ ควรจะใช้ส่วนของใบและก้านใบ ถึงแม้ก้านใบจะมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าลำต้นก็ตาม ทั้งนี้เพราะก้านใบจะเป็นส่วนที่ติดอยู่กับใบและมีปริมาณน้อย เพื่อลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการแยกเอาส่วนก้านใบออก ดังนั้นสามารถใช้ทั้งใบและก้านใบร่วมกัน สำหรับส่วนลำต้นนั้นจะมีกากใยมากทำให้ยุ่งยากในการสกัดจึงไม่นิยมใช้

2.4.3 <u>อายุการเก็บเกี่ยว</u>

อายุของใบไม้จะมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สะสมอยู่ในใบ เนื่องจากปริมาณโปรตีนขึ้นอยู่กับภาวะการสังเคราะห์และการเสื่อมสลายในระยะกำลังเจริญช่วงแรกๆ จะมีการสังเคราะห์โปรตีนมากและเก็บสะสมไว้ในใบ เมื่อพืชเริ่มเข้าสู่ภาวะการเจริญเติบโตเต็มที่จะเข้าสู่ช่วงแก่ โปรตีนที่เก็บสะสมในใบแต่แรกจะถูกไฮโดรไลซ์ให้เป็นกรดอะมิโนและส่งออกไปจากใบ ทำให้เมื่อพืชยิ่งมีอายุมากขึ้นยิ่งทำให้ปริมาณโปรตีนสะสมในใบลดลงและเมื่อใบแก่จะมีการเสื่อมสลายกลายเป็น non-protein nitrogen อย่างรวดเร็ว ดังนั้นเมื่อเรานำมาสกัดเอาโปรตีนถ้าใช้ใบที่แก่จะได้ปริมาณโปรตีนน้อยกว่าใบอ่อนทั้งนี้แล้วชนิดและพันธุ์พืชว่าช่วงใดจะมีความเหมาะสมในการนำมาสกัดโปรตีน (Kung และคณะ, 1980)

นอกจากนี้ ความสามารถในการสกัดได้และปริมาณโปรตีนจะลดลงเมื่อพืชเริ่มเข้าสู่ภาวะการเสื่อมสลายหรือเมื่อเริ่มแก่ ซึ่งจะมีปริมาณเส้นใยมากขึ้นจะมีผลทำให้การหลุดออกมาของโปรตีนจากเซลพืชจะลดลงเนื่องจากโปรตีนอาจถูกกักไว้โดยเส้นใย ในระหว่างขั้นตอนการสกัดโปรตีนช่วงการแยกโปรตีนออกจากเส้นใย (Ostrowski, 1979)

ในทางปฏิบัติแล้วจะมีความพยายามให้พืชมีช่วงกำลังเจริญเติบโต (vegetative growth) อยู่เสมอเพื่อให้ได้วัตถุดิบที่มีปริมาณโปรตีนสะสมมาก โดยทั่วไปจะใช้วิธีการตัดใบเมื่อพืชแตกใบใหม่จะมีการสังเคราะห์โปรตีนขึ้นใหม่ซึ่งสามารถนำไปใช้สกัดโปรตีนได้ดีเช่นเดียวกัน (Arkcoll และ Festenstein, 1971)

2.4.4 สารอาหาร

เป็นที่เข้าใจกันว่า สารอาหารทั้งหมดมีผลต่อปริมาณของผลผลิตที่เป็นสารประกอบในพืช ซึ่งมีผลต่อปริมาณโปรตีนด้วยรวมทั้งการใช้ปุ๋ย ไนโตรเจน(N) ฟอสฟอรัส(P) และ โปแตสเซียม (K) ก็จะมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ได้

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณไนโตรเจนในการสกัดได้ของโปรตีน คือ อัตราส่วนของ fibre:juice ถ้ามีค่าน้อยจะมีไนโตรเจนมาก อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์โปรตีนสามารถพิจารณาได้จากอัตราส่วนของโปรตีนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด การใช้ฟอสฟอรัสและโปแตสเซียมจะสามารถเพิ่มอัตราส่วนทั้งสองนี้รวมถึงเพิ่มการสังเคราะห์ด้วยแต่ผลของโปแตสเซียมจะมีน้อยเนื่องจากพืชได้รับโปแตสเซียมจากดินอย่างเพียงพอแล้ว ดังนั้นการใช้ปุ๋ยที่มีโปแตสเซียมจึงไม่มีผลมากนัก ความเกี่ยวข้องของโปแตสเซียมจะสำคัญในด้านการสังเคราะห์โปรตีนและสามารถป้องกันการเพิ่มของ soluble nitrogen (Arkcoll และ Festenstein, 1971)

2.4.5 สภาพภูมิอากาศและฤดูกาล

ในฤดูต่างๆ จะมีปริมาณความชื้น แสงแดดและอุณหภูมิแตกต่างกันไปซึ่งจะส่งผลต่อเมตาบอลิซึมของพืชในการสังเคราะห์โปรตีน ความอุดมสมบูรณ์ของดินอันเนื่องมาจากฝนจะทำให้พืชเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วซึ่งส่งผลต่อปริมาณโปรตีนด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์ของพืชด้วย (Pirie, 1971)

2.4.6 กรรมวิธีที่ใช้ในการผลิต

กรรมวิธีในการผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบไม้มีขั้นตอนต่างๆ หลายขั้นตอน (เยาวลักษณ์ สุรพันธ์พิศิษฎ์, 2518; Telek และ Graham, 1983) ดังนี้

2.4.6.1 การตีป่น (crushing)

เป็นการตีป่นใบไม้ให้แหลกละเอียด มีความจำเป็นมากสำหรับการที่จะนำโปรตีนออกมาจากเซลพืช ซึ่งมักจะทำควบคู่ไปกับการสกัดโดยจะนำสารละลายที่ใช้ในการสกัดเทลงในใบไม้ และตีป่นใบไม้ให้ละเอียดด้วยเครื่องมือทำให้เซลพืชแตกชนิดต่างๆ เช่น เครื่องปั่นละเอียด (blender) ซึ่งต้องมีการใช้สารละลายเป็นตัวสกัด (Wang และ Kinsella, 1975; Sheen และ Sheen, 1986) หรือการใช้เครื่องมือกลบดให้ละเอียดซึ่งไม่ต้องใช้สารสกัด (Knuckles และ Kohler, 1982; De Jong และ Sounders, 1986)

2.4.6.2 การสกัด (extraction)

เป็นการสกัดโปรตีนให้ออกมาจากเซลใบพืช ในการสกัดสามารถใช้สารเคมีได้หลายชนิด เช่น น้ำ เกลือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ Tris buffer เป็นต้น รวมทั้งอาจ ใช้เอนไซม์ cellulase ช่วยในการย่อยสลายเซลลูโลสที่ผนังเซลของพืช ซึ่งจะทำให้โปรตีนถูกสกัดออกมาจากเซลพืชได้ดียิ่งขึ้น (Bestchart และ Kinsella, 1973) นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการสกัดจะขึ้นอยู่กับ

2.4.6.2.1 ชนิดของสารสกัด

การใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็นสารสกัดนั้น เมื่อเติมเกลือที่มีสมบัติเป็นกลางจำนวนเล็กน้อยลงในสารละลายโปรตีนจากใบไม้จะทำให้ globular protein ละลายได้ดี ปรากฏการณ์เช่นนี้เรียกว่า "salting in" เนื่องจาก globular protein เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้ยากมาก การที่เติมเกลือจำนวนเล็กน้อยลงไปแล้วทำให้โปรตีนละลายน้ำได้ดีขึ้น สามารถอธิบายได้ว่าการที่สารชนิดหนึ่งจะละลายในตัวทำละลายได้มากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายด้วยกันและแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับตัวทำละลาย ถ้าแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายด้วยกันลดน้อยลงการละลายจะดีขึ้น การเติมเกลือลงไป อิออนเล็กๆ ของเกลือจะไปจับกับหมู่อิออนในโมเลกุลของโปรตีน ทำให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนลดลงซึ่งมีผลทำให้การละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น (Pomeranz, 1991) โดยทั่วไปถ้าความเข้มข้นของเกลือมากกว่า 0.3 โมลาร์ จึงจะทำให้เกิด "salting out" (Lehninger, 1977)

Wang และ Kinsella (1975) ได้ศึกษาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากใบอัลฟัลฟา (alfalfa) พบว่าการใช้สารเคมีในการสกัดต่างชนิดกันจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ การสกัดโปรตีนจากใบอัลฟัลฟาพบว่า 40-50 % ของโปรตีนในน้ำหนักใบสดจะออกมาอยู่ในสารละลาย ปริมาณโปรตีนที่ได้สูงที่สุดเมื่อใช้ NaOH (0.05M) และต่ำสุดเมื่อใช้น้ำกลั่น อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณโปรตีนแม้ใช้สารสกัดต่างชนิดกัน ดังนั้นน้ำกลั่นน่าจะมีประสิทธิภาพพอเพียงในการนำมาใช้เป็นสารสกัดโปรตีนจากใบอัลฟัลฟา

2.4.6.2.2 อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อสารสกัด

Lu และ Kinsella (1972) ได้ศึกษาอัตราส่วนของวัตถุดิบต่อสารเคมีโดยใช้ภาวะในการสกัดที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 1 ชั่วโมง ใช้น้ำที่ปรับ pH 12 เป็นสารสกัดโปรตีนจากใบอัลฟัลฟา พบว่า การใช้อัตราส่วนต่างกันจะให้ปริมาณโปรตีนต่างกันและพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของสารละลายต่อวัตถุดิบที่ใช้มากยิ่งขึ้น ปริมาณไนโตรเจนที่สกัดได้ก็ยิ่งมากขึ้นและที่เหมาะสมสำหรับ alfalfa leaf meal คือ 20 : 1

2.4.6.2.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัด

นอกจากการศึกษาอัตราส่วนของวัตถุดิบต่อสารเคมีแล้ว Lu และ Kinsella (1972) ยังได้ทดลองถึงอิทธิพลของ pH ของสารละลายของการใช้และไม่ใช้ buffer ที่มีผลต่อปริมาณไนโตรเจนที่สกัดได้ปริมาณของไนโตรเจนที่สกัดได้จากการใช้วัตถุดิบ 1 กรัมต่อการใช้สารสกัด 20 มิลลิลิตร จะเพิ่มขึ้น เมื่อ pH เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนละลายได้ดีในสภาพที่เป็นด่าง ดังนั้นที่ pH สูง จะมีผลทำให้โปรตีนจากใบไม้ละลายได้มากขึ้น แต่ถ้าใช้ pH สูงเกินไปแม้จะได้ปริมาณโปรตีนสูงแต่โปรตีนบางส่วนจะเสียสภาพไป (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2538) และจะเห็นได้ว่าความสามารถในการสกัดของโปรตีน จะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการใช้หรือไม่ใช้บัฟเฟอร์ในการสกัดแต่จะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดมากกว่า

ในการใช้ภาวะที่เป็นด่างในการสกัดโปรตีนแม้จะเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีนซึ่งส่งผลให้สามารถสกัดโปรตีนออกมาจากเซลพืชได้มากนั้น ปัญหาที่ต้องคำนึงถึงที่สำคัญคือการเกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่า racemization และ การเกิดการเชื่อมกัน(protein cross-link) ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนหรือโปรตีนกับกรดอะมิโนอิสระเช่นการเกิด lysinoalanine ทำให้โปรตีนหรือกรดอะมิโนเหล่านั้นไม่สามารถย่อยในร่างกายได้ และจะไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์เป็นโปรตีนในร่างกายได้เหมือนกรดอะมิโนหรือโปรตีนตามปกติทั่วไป นอกจากนี้มีรายงานงานวิจัยของ Woodard และคณะ (1975) พบว่า lysinoalanine จะไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดของหนูทดลองแต่จะตรวจพบในปัสสาวะและไต (สายพันธุ์ rat เท่านั้น ส่วนสายพันธุ์อื่นได้แก่ mice, quail, hamster และลิงจะไม่พบความเป็นพิษ) และพบว่าเกิดภาวะไตเป็นพิษ (nephrotoxic) (Fennema, 1996)

ปฏิกิริยาการเกิด racemization นั้นจะเกิดเมื่อ pH เป็นด่างซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากส่วนปลายของกรดอะมิโน(amino acid residual) ซึ่งปกติจะอยู่ในรูปแอล-ฟอร์ม (L form) จะถูกเปลี่ยนเป็นรูป ดี-ฟอร์ม (D- form) ซึ่งร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ได้และอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อไตได้ กลไกการเกิดปฏิกิริยานี้เกิดจากประจุบวกของ α - carbon atom ถูกดึงประจุบวกไปโดยไฮดรอกซีอิออน (OH^-) ในสารละลายด่าง จะทำให้โมเลกุลโปรตีนหรือกรด

อะมิโนสูญเสียโครงสร้าง tetrahedral asymmetry ไป เมื่อโมเลกุลมีสภาพเป็นประจุลบก็จะเกิดการแย่งกันเข้าจับระหว่างปลายของกรดอะมิโนที่เป็นอิสระทั้งที่อยู่ในโมเลกุลของโปรตีนเองหรือของกรดอะมิโนอิสระจึงเรียกปฏิกิริยานี้ว่า racemization ซึ่งกรดอะมิโนที่สามารถเกิดปฏิกิริยานี้ได้คือ Asp Ser Cys Glu Phe Asn และ Thr ซึ่งเร็วกว่ากรดอะมิโนตัวอื่นๆ อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยานี้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮดรอกซีอิออนและความเข้มข้นของโปรตีนซึ่งถ้ามีความเข้มข้นมากหรือ pH เป็นด่างสูงก็จะเกิดได้เร็วและมีปริมาณมาก (Fennema, 1996)

การเกิด lysinoalanine ซึ่งเป็นการเกิดการเชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุลโดยพันธะทั้งในและนอกโมเลกุล และจะเกิดในภาวะที่เป็นด่างเช่นเดียวกันกับ racemization ซึ่งจะยิ่งเกิดเร็วและมีปริมาณมากเมื่อ pH 10 ขึ้นไป กลไกการเกิดจะเกิดจากปลายอิสระของกรดอะมิโนชนิด ε NH_2 ของ lysine จะจับกันกับ dehydroalanine ซึ่งเกิดจากหมู่ไฮดรอกซีอิออนของสารละลายในภาวะที่เป็นด่างดึงประจุบวกของโมเลกุลกรดอะมิโน alanine การเกิด protein cross-link ทำให้ร่างกายไม่สามารถนำกรดอะมิโนชนิดนี้ไปใช้ไม่ได้และอาจเกิดความเป็นพิษได้เช่นเดียวกัน นอกจาก lysine แล้วยังมีกรดอะมิโนชนิดอื่นเกิดได้เป็นสารประกอบที่ร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ได้เช่นเดียวกันได้แก่ serine cystine และ cysteine โดยที่พันธะคู่ของ dehydroalanine จะทำปฏิกิริยากับหมู่ -SH และ -NH_2 เช่น cystine เกิดเป็น lanthionine เป็นต้น (Fennema, 1996)

2.4.6.2.4 อุณหภูมิและเวลา

Lu และ Kinsella (1972) ได้ศึกษาผลของการใช้อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากใบอัลฟัลฟา ซึ่งพบว่าอุณหภูมิและเวลามีอิทธิพลต่อปริมาณไนโตรเจนที่สกัดได้ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดเป็น 70 °C ปริมาณไนโตรเจนที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้น เนื่องจากไนโตรเจนที่อยู่ในส่วนคลอโรพลาสต์ และที่อยู่ในส่วนต่างๆ ของพืชจะถูกสกัดออกมาได้มากขึ้น เนื่องจากความร้อนจะทำให้เซลปลดปล่อยไนโตรเจนได้มากขึ้น และที่อุณหภูมิที่สูงกว่า 70 °C ปริมาณไนโตรเจนที่ได้มีแนวโน้มที่จะลดลงเนื่องจากอุณหภูมิสูงจะทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอนและติดค้างอยู่ในเนื้อเยื่อ ต้องระวังเรื่องการสูญเสียสภาพของโปรตีนเนื่องจากความร้อนด้วย นอกจากนี้ช่วงเวลาที่ใช้ไม่มีอิทธิพลมากต่อปริมาณไนโตรเจนที่สกัดได้ ซึ่งโดยทั่วไปมักจะใช้เวลา 30-60 นาที

2.4.6.3 <u>การแยกกาก</u>

ส่วนของโปรตีนที่สกัดออกมาจะถูกแยกออกจากกากซึ่งส่วนใหญ่เป็นเส้นใย (fiber) ที่เหลือได้ด้วยการกรองด้วยถุงกรอง ผ้าขาวบางหรือใช้การหมุนเหวี่ยงเอาเศษเส้นใยที่เหลือออกไป ก็จะได้ของเหลวใสที่มีโปรตีนละลายอยู่ (Bestchart และ Kinsella,1973)

2.4.6.4 <u>การตกตะกอนโปรตีน</u>

เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในการเตรียมโปรตีนเข้มข้นจากใบไม้ จะเป็นการตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากใบไม้ สามารถทำได้โดยใช้วิธีทางเคมีและกายภาพ ซึ่งมีหลายวิธี วิธีที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป มีดังนี้

2.4.6.4.1 การใช้ความร้อน

แม้ว่าโปรตีนที่ละลายอยู่ในสารละลายที่สกัดได้จากใบไม้จะสามารถตกตะกอนลงมาได้เอง โดยที่อนุภาคเล็ก ๆ ของโปรตีนจะมีการจับตัวกันโดยไม่ต้องใช้ความร้อนเข้าช่วยก็ตาม แต่จะใช้เวลานาน 1-2 วัน ดังนั้น ในทางปฏิบัติจึงมีการให้ความร้อนเพื่อให้เกิดการตกตะกอนของอนุภาคโปรตีนที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายที่สกัดได้ (Pirie, 1975)

ในช่วงอุณหภูมิ 0-40 °C โปรตีนละลายได้มากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 40 °C โปรตีนจะเริ่มสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) โปรตีนจะทำหน้าที่ได้ดีต่อเมื่ออยู่ในอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสม ถ้าอุณหภูมิและ pH เปลี่ยนไปโปรตีนจะสูญเสียสภาพธรรมชาติ และไม่ทำหน้าที่หรือมีลักษณะผิดไปจากเดิม (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2538)

การตกตะกอนโปรตีนมี 3 ขั้นตอน คือการสูญเสียสภาพธรรมชาติ การเกิดตะกอนขุ่นและการจับตัวเป็นก้อนนุ่ม การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเป็นการจัดตัวกันของโมเลกุลเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยังไม่เพียงพอที่จะเกิดตะกอนได้ การเกิดตะกอนขุ่นเป็นขั้นตอนที่โมเลกุลที่เปลี่ยนสภาพเคลื่อนที่เข้าหากันและจับตัวกันด้วยแรง Van de Waals ทั้งนี้เมื่อโมเลกุลเคลื่อนเข้าใกล้กันจะมีทั้งแรงดึงดูดและแรงผลักกัน ซึ่งแรงดูดคือแรง Van de Waals ส่วนแรงผลักดันเกิดจากการเกยกันของประจุชั้นนอก อนุภาคจะจับตัวกันเป็นตะกอนหรือไม่ขึ้นอยู่กับแรงผลักและแรงดูดกัน ถ้าแรงดูดกันมากกว่าแรงที่ผลักกัน โปรตีนจะตกตะกอนทันทีและถ้าความร้อนที่โปรตีนได้รับสูงมากพออนุภาคโปรตีนจะสามารถเข้าใกล้กันจนชิดมากและเกิดเป็นก้อน (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2538)

การใช้ความร้อนในการตกตะกอนโปรตีนเป็นวิธีที่ยอมรับและใช้กันอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้การใช้ความร้อนจะช่วยลดการปนเปื้อนอันเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ และช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ไม่ต้องการด้วย (Hood และ Brunner, 1975)

ถ้าตกตะกอนโปรตีนที่สกัดได้จากใบไม้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิต่างกัน จะได้โปรตีนเข้มข้นจากใบไม้ 2 ชนิด (Byers, 1983)

- โปรตีนชนิดคลอโรพลาสติก (chloroplastic protein, F2P) ใช้อุณหภูมิในการตกตะกอนที่ 45-60 °C ซึ่งแล้วแต่ชนิดของพืชจะมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์อยู่ด้วย องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในปฏิกิริยา carboxylation และ respiration ซึ่งอยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์ มีน้ำหนักโมเลกุล 500,000-600,000 ดาลตัน มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตกตะกอน 18S

- โปรตีนชนิดไซโตพลาสมิก (cytoplasmic protein, F1P) โดยใช้อุณหภูมิขั้นแรก 45-60 °C ส่วนที่เป็นคลอโรพลาสติกโปรตีนจะตกตะกอนออกมา เมื่อแยกส่วนนี้ออกไปแล้วนำส่วนใสที่เหลือมาให้ความร้อนที่ 80 °C จะได้ตะกอนสีขาว เนื่องจากมีคลอโรฟิลเจือปนอยู่น้อย น้ำหนักโมเลกุล 10,000-300,000 ดาลตัน และมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตกตะกอน 4-10S

Nagy และคณะ (1978) ศึกษาการใช้ความร้อนตกตะกอนโปรตีนจากใบอัลฟัลฟา พบว่าโปรตีนที่ได้จากการสกัดที่ไม่ได้แยกส่วน (whole leaf protein) โปรตีนชนิดคลอโรพลาสติกและโปรตีนชนิดไซโตพลาสมิกมีกรดอะมิโนชนิดจำเป็นแตกต่างกัน การตกตะกอนโปรตีนที่สกัดได้ในใบอัลฟัลฟาด้วยความร้อน 2 ระดับ จะแยกโปรตีนที่ตกตะกอนเป็น 2 ส่วน คือ โปรตีนชนิดคลอโรพลาสติก และโปรตีนชนิดไซโตพลาสมิก ซึ่งจะพบว่าโปรตีนชนิดไซโตพลาสมิกมีกรดอะมิโนจำเป็นมากกว่าโปรตีนชนิดโปรตีนชนิดคลอโรพลาสติก ทั้งยังมีสีขาวแต่โปรตีนชนิดคลอโรพลาสติกจะมีสีเขียวเนื่องจากมีโรฟิลอยู่มาก

2.4.6.4.2. การตกตะกอนที่จุดไอโซอิเลคตริก

เนื่องจากโปรตีนละลายได้น้อยที่สุดที่จุดไอโซอิเลคตริก (isoelectric point, IP) ที่จุด IP โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำลดลง จึงรวมกันเป็นตะกอน โปรตีนส่วนใหญ่จะตกตะกอนที่ pH 4 ถึง 5 ลักษณะตะกอนโปรตีนที่ได้มีลักษณะอ่อนนุ่ม ละเอียด (บุญยืน สาริกะภูติ, 2522)

บุญธิดา โฆษิตทรัพย์(2534) ได้ศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากในผักตบชวา จากผลการทดลอง การตกตะกอนโปรตีนที่ pH 2 3 4 และ 5 โดยการปรับ pH ของสารละลายโปรตีน (green juice) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล พบว่าการตกตะกอนโปรตีนที่ pH ต่างกันได้ปริมาณโปรตีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่การตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4 ได้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด

Sheen (1991) ได้ศึกษาการตกตะกอนที่จุดไอโซอิเลคตริก ของ F-1-P จากใบยาสูบ ใบผักโขม ใบฝ้าย และใบข้าวโพด พบว่า F-1-P ของทั้ง 4 ชนิด จะมีจุด ไอโซอิเลคตริกที่ pH 4.4-4.7

2.4.6.4.3 การเติมเกลือ

การเติมเกลือลงไปมากในสารละลายของโปรตีนในน้ำ จะทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมา (salting out) การที่เติมเกลือลงไปแล้วโปรตีนตกตะกอนออกมาเนื่องจากเกลือจะไปแย่งน้ำซึ่งละลายโปรตีนให้มาละลายเกลือเอง เมื่อเติมเกลือลงไปมากเกลือจะแย่งน้ำจากโปรตีนมาละลายตัวเองได้มากขึ้นโปรตีนจึงตกตะกอนมากขึ้น

กำลังของอิออน (ionic strength) มีส่วนช่วยให้โปรตีนตกตะกอนดีขึ้น ถ้ายิ่งมีกำลังของอิออนสูงยิ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนได้มาก เกลือที่เป็น divalent ion เช่น $MgSO_4$ $MgCl_2$ $CaCl_2$ และเกลือของโลหะหนักที่เป็น divalent ion เช่น $Zn(CH_3COO)_2$ $Cu(CH_3COO)_2$ $PbCCH_3(COO)_2$ $FeSO_4$ $(NH_4)_2SO_4$ divalent ion เหล่านี้มีกำลังของอิออน (ionic strength) สูงกว่าทำให้สามารถตกตะกอนโปรตีนได้มากกว่า monovalent ion เช่น NaCl KCI NH_4Cl

Hood และ Brunner (1975) ได้ศึกษาวิธีการตกตะกอนโปรตีนจากใบอัลฟัลฟาด้วยวิธีต่างๆ 3 วิธี คือ ตกตะกอนด้วยเกลือ กรด และความร้อน จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยเกลือจะมีปริมาณเถ้าอยู่สูง เนื่องจากยังไม่ได้ผ่านกระบวนการ dialyzation ซึ่งกระบวนการนี้สามารถกำจัดเกลือออกไปจากโปรตีนได้ ซึ่งโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยเกลือเมื่อไม่ได้ผ่านกระบวนการนี้ทำให้ยังคงมีเกลืออยู่ในปริมาณสูงจึงเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ หรืออยู่ในรูปอนินทรีย์สารทำให้มีปริมาณเถ้าสูง

สำหรับในส่วนที่มีปริมาณโปรตีนสูง จากการตกตะกอนด้วยเกลือ ตกตะกอนด้วยกรด และตกตะกอนด้วยความร้อน จะมีปริมาณโปรตีนสูงและจะมีปริมาณเถ้าต่ำ และสำหรับส่วนที่เป็นสารละลายภายหลังแยกเอาตะกอนที่ตกตะกอนด้วยเกลือ ตกตะกอนด้วยกรด และตกตะกอนด้วยความร้อน ซึ่งส่วนนี้จะเป็นสารละลายใส พบว่าการตกตะกอนด้วยเกลือจะมีปริมาณเถ้าอยู่สูง เนื่องจากเป็นสารละลายที่ได้หลังจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียซัลเฟต ในขณะที่การตกด้วยกรดและความร้อนมีปริมาณเถ้าต่ำแสดงว่า เกลือแอมโมเนียซัลเฟตมีผลต่อปริมาณเถ้าที่ได้ นั่นคือเถ้าของตะกอนโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตส่วนหนึ่งมาจากเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต สำหรับปริมาณคาร์โบไฮเดรตนั้น จะเห็นว่าตะกอนที่ได้จากการตกด้วยกรดและความร้อนจะมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตอยู่สูง ในขณะที่มีปริมาณโปรตีนต่ำจึงเป็นไปได้ว่าเกิด interaction ระหว่างโปรตีนกับคาร์โบไฮเดรต จึงสรุปได้ว่า การตกตะกอนสาร

ละลายโปรตีนจากใบอัลฟัลฟาด้วยความร้อนจะมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด การใช้เกลือและกรดมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน

2.4.6.4.4 การเติม alkaloidal reagent

alkaloidal reagent คือสารที่ทำให้เบสอินทรีย์ (organic base) ตกตะกอนได้เช่น อัลคาลอยด์ ซึ่งอยู่ในพืชเป็นเบสอินทรีย์สามารถตกตะกอนได้เมื่อเติมรีเอเจนต์บางชนิดลงไป เช่น กรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) เป็นต้น สาร alkaloidal reagent เหล่านี้นำมาใช้เพื่อทำให้โปรตีนตกตะกอนได้โดยที่ไฮโดรเจนอิออนจากกรดทำให้โปรตีนในสารละลายมีประจุบวก โปรตีนซึ่งมีประจุบวกนี้เองรวมตัวกับอนุมูลกรดที่มีประจุลบเกิดเป็นเกลือซึ่งไม่ละลายน้ำขึ้น จึงทำให้โปรตีนตกตะกอนออกมา (Lu และ Kinsella, 1972; Knuckles และคณะ, 1979)

2.4.6.4.5 การเติมตัวทำละลายอินทรีย์

เมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อัลกอฮอล์หรืออะซีโตน ลงในสารละลายของโปรตีนจะทำให้โปรตีนตกตะกอนออกมา เนื่องจากค่าคงตัวไดอิเลคตริกของสารทั้งสองนี้มีค่าน้อยกว่าน้ำ โดยที่น้ำ อัลกอฮอล์ และอะซีโตน มีค่า dielectric constant เท่ากับ 80 24 และ 21 ตามลำดับ เมื่อค่าคงตัวไดอิเลคตริกในสารละลายโปรตีนลดลงแรงดึงดูดระหว่างประจุบวกกับประจุลบจะมีค่าเพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อเติมอัลกอฮอล์หรืออะซีโตนจะทำให้แรงดึงดูดระหว่างอิออนเพิ่มขึ้นจึงทำให้โปรตีนแตกตัวเป็นอิออนได้น้อยลงและจับกันเป็นก้อนทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมา

Bray และ Humphire (1978) ได้ศึกษาการตกตะกอนโปรตีนชนิดคลอโรพลาสติกจากใบอัลฟัลฟา โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรตีนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ pH อุณหภูมิ และชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

2.4.6.4.6 การทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration)

วิธีนี้จะเป็นการทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นโดยโปรตีนได้ตกตะกอนลงมาการกรองแบบอุลตราฟิวเตรชันนี้จะใช้ semipermeable membrane กรองเอาสารโมเลกุลขนาดเล็กออก ส่วนโปรตีนยังคงอยู่ข้างบนในหลอดกรอง ใช้ความดันหรือแรงเหวี่ยง (centrifugal force) ช่วยเพื่อให้สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า molecular weight cut off ของเยื่อลอดออกมาได้เร็วขึ้น (Telek และ Graham, 1983)

2.4.6.4.7 การทำให้เข้มข้นโดยวิธี dialysis

วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นอีกวิธีหนึ่ง โดยที่โปรตีนไม่ได้ตกตะกอน

โปรตีนละลายอยู่ในสารละลายและมีสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กปนอยู่ด้วยเช่น อิออนของเกลือต่างๆ ทำได้โดยนำสารละลายโปรตีนมาใส่ในถุงที่ทำด้วย semi-permeable membrane แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่น สารโมเลกุลขนาดเล็กจะลอดรูของ membrane ออกมาได้และเหลือโปรตีนอยู่ในถุง (Telek และ Graham, 1983)

2.4.6.5 <u>การแยกตะกอนโปรตีน</u>

โปรตีนจะถูกแยกออกโดยการหมุนเหวี่ยงจะได้โปรตีนที่มีลักษณะเป็นของเหลวกึ่งแข็ง (cake) จากนั้นนำมาทำให้แตกออกจากกันโดยใช้น้ำ เพื่อเป็นการล้างตะกอนโดยจะใช้น้ำ 10-20 เท่าของตะกอนโปรตีนเพื่อทำให้บริสุทธิ์ขึ้น (Telek และ Graham, 1983)

2.4.6.6 <u>การเก็บรักษา</u>

การเก็บรักษาโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชที่ผลิตได้สามารถเก็บได้สองลักษณะคือแบบแห้งและแบบเปียกซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี ที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปมีดังนี้

- ทำแห้งแบบถาด (tray dry) ซึ่งใช้กระแสลมที่อุณหภูมิ 60 °C และต้องคำนึงถึงการเกิด case hardening ขึ้น ซึ่งทำให้อัตราการแห้งเป็นไปอย่างช้าๆ สาเหตุก็คือการที่โปรตีนสูญเสียน้ำออกไปจะเกิดการแข็งตัวบริเวณผิวของผลิตภัณฑ์ทำให้เป็นอุปสรรคในการทำให้แห้ง (Arkcoll, 1973)

- ทำแห้งโดยใช้วิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและสามารถทำปฏิกิริยากับน้ำได้ดีกว่าการทำแห้งแบบถาด (tray dry) (Arkcoll, 1973)

- ทำแห้งโดยใช้วิธีพ่นลมร้อน (spray dry) จะให้โปรตีนเข้มข้นจากใบพืชมีสีที่ดีกว่าการใช้การทำแห้งแบบถาด (Arkcoll, 1973)

- การแช่แข็งอย่างรวดเร็ว ภายใน 2-3 นาที

- การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปซึ่งจะต้องใช้ประมาณ 15 % ของผลิตภัณฑ์

- การเติมกรด ถ้าใช้กรดแลคติกต้องใช้ถึง 15 % แต่ถ้าใช้กรดอะซิติกจะใช้เพียง 2 % ก็สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Telek และ Graham, 1983)

2.4.6.7 <u>การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ขึ้น</u>

โปรตีนเข้มข้นจากใบพืชเมื่อนำมาทำให้แห้งโดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นจะมีโปรตีนอยู่ประมาณ 50-60 % สีและกลิ่นของโปรตีนเข้มข้นที่มีอยู่ซึ่งเกิดจากมีส่วนของรงควัตถุคลอโรฟิลล์อยู่มาก ทำให้คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสลดน้อยลง การทำให้บริสุทธิ์ เช่นการใช้อัลกอฮอล์ เช่น เอธานอล บิวทานอลและอะซิโตนจะช่วยให้โปรตีนมีคุณภาพทางด้านการยอมรับดีขึ้นโดยทำให้กลิ่นรสที่ไม่เป็นที่ยอมรับลดลง (Telek และ Graham, 1983)

2.5 คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนเข้มข้นจากใบพืช

กรดอะมิโนจำเป็นที่มีอยู่ในโปรตีนเข้มข้นจากใบพืช เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพดี เช่น เนื้อสัตว์ ไข่ และนม ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งจะพบว่ามีเพียงเมทไธโอนีนเท่านั้นที่มีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่ FAO กำหนด จึงจัดเป็นกรดอะมิโนจำกัด (limiting amino acid) (Pomeranz, 1991) ส่วนไลซีน และเฟนิลอะลานีนของโปรตีนเข้มข้นจากใบไม้จะมีค่าสูงกว่าโปรตีนจากพืชแหล่งอื่น ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาเป็นอาหารโปรตีน

ตารางที่ 2.1 ปริมาณของกรดอะมิโนชนิดจำเป็นที่พบในโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชและในแหล่งโปรตีนต่างๆ

แหล่งโปรตีน	กรดอะมิโนชนิดจำเป็น (กรัม/ 100 กรัมโปรตีน)							
	Lys	Phe	Met	Thr	Leu	Ileu	Val	Try
โปรตีนเข้มข้นจากใบพืช*	6.3	6.0	2.1	5.2	5.3	9.8	6.3	1.6
โปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ**	6.6	4.0	1.3	4.9	9.1	5.1	8.2	1.5
ข้าวโพด	2.3	5.0	3.1	3.7	15.0	6.4	5.3	0.6
ข้าว	3.2	5.0	3.0	3.8	8.2	5.2	6.2	1.3
ข้าวสาลี	2.7	5.1	2.5	3.3	7.0	4.0	4.3	1.2
กากถั่วเหลือง	6.4	4.8	0.6	3.7	6.1	3.5	5.0	1.2
เนื้อ ไก่ ปลา	8.1	4.9	3.3	4.6	6.3	7.7	5.8	1.3
ไข่	7.2	6.3	4.1	4.3	4.2	8.0	7.3	1.5
นม	8.2	5.7	3.4	4.5	11.3	8.5	8.5	1.6
มาตรฐานที่ FAO กำหนด	4.2	2.8	2.2	2.8	4.8	4.2	4.2	1.4

* ค่าเฉลี่ยโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชชนิด fraction 1 protein จากพืช 10 ชนิด

** โปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบชนิด fraction 1 protein

ที่มา Nagy และคณะ (1978)

2.6 สมบัติการใช้งานของโปตีนเข้มข้นจากใบพืช

โปรตีนมีหน้าที่ที่สำคัญมากในอาหาร โดยแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ หน้าที่เป็นสารอาหารซึ่งให้คุณค่าทางโภชนาการและหน้าที่เป็นสารปรุงแต่งซึ่งเป็นหน้าที่ที่จะต้องอาศัยสมบัติของโปรตีนที่เรียกว่า "สมบัติการใช้งาน" (functional property) ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สมบัติการใช้งานของโปรตีน

สมบัติการใช้งาน	ลักษณะการทำงาน	ตัวอย่างอาหาร
การละลาย	ทำให้อาหารละลายน้ำ ขึ้นอยู่กับpH	เครื่องดื่ม
การดูดซับน้ำ และจับตัวกับน้ำ	เกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำ เก็บกักน้ำ	เนื้อสัตว์ ไส้กรอก ขนมเค้ก
การดูดซับไขมัน	เกาะตัวกับไขมัน	เนื้อสัตว์ ไส้กรอก
การเพิ่มความหนืด	ทำให้อาหารข้นมากขึ้น จับน้ำไว้	ซุบ น้ำเกรวี่
การเกิดเจล	ทำให้เกิดเนื้อโปรตีนและแข็งตัว	เนื้อสัตว์ เต้าหู้อ่อน
การเกาะตัว	ทำหน้าที่เป็นตัวประสาน	เนื้อสัตว์ ไส้กรอก
การเพิ่มความยืดหยุ่น	เกิดพันธะไฮโดรเจนในกลูเตนและเกิดพันธะไดซัลไฟด์	เนื้อสัตว์ ขนมอบ
การเกิดอิมัลชั่น	ทำให้ไขมันกระจายตัวในอิมัลชั่น	ไส้กรอก เค้ก
การเกิดโฟม	ทำให้เกิดฟิล์มรอบๆ ฟองอากาศ	แองเจลเค้ก (angel cake)

Pomeranz (1991)

นอกจากโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชนี้จะมีคุณค่าทางโภชนาการที่ดีแล้ว สมบัติการใช้งานของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบนี้สามารถนำมาใช้และเป็นที่ยอมรับได้ในอาหาร สมบัติการใช้งานที่สำคัญ คือ ความสามารถในการดูดซับน้ำ (water and fat absorption) ความสามารถในการละลาย (solubility) ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsification) และความสามารถในการเกิดโฟม (foaming property) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การจับตัวกับน้ำและน้ำมัน (water and fat binding capacity)

โปรตีนสามารถจับตัวกับน้ำได้ ซึ่งมีความสำคัญต่ออาหารมาก การจับตัวกับน้ำเกิดจากกลุ่มไนโตรเจนและออกซิเจนมี unshared electron 1 คู่ เป็นอิเล็กตรอนที่สามารถมีพันธะไฮโดรเจนได้ ไนโตรเจนที่เกี่ยวข้องกับพันธะเปปไทด์และไนโตรเจนที่อยู่ในกลุ่มอะมิโนอิสระก็มีสภาพเช่นเดียวกัน คือ มีประจุบวกที่สามารถมีพันธะกับออกซิเจนของน้ำได้ ออกซิเจนที่อยู่ในกลุ่มคาร์บอกซิลหรืออยู่ในกลุ่มคาร์บอนิล (carbonyl) ซึ่งจะมีประจุลบค่อนข้างสูงสามารถจับตัวกับไฮโดรเจนของน้ำได้ด้วยพันธะที่แข็งแรงกว่าการจับตัวกับไนโตรเจน นอกจากนี้โมเลกุลน้ำยังสามารถจับตัวกันเองได้ด้วย โปรตีนจึงมีโมเลกุลน้ำเกาะอยู่เป็นกลุ่มใหญ่มีความหนามากกว่า 1 ชั้น ถ้าอาหารมีสารอื่นๆ ที่สามารถจับตัวกับน้ำได้อยู่ด้วยจะเกิดการแย่งน้ำกัน สารอิเลคโตรไลต์ น้ำตาล แอลกอฮอล์ ฯลฯ จะแย่งน้ำกับโปรตีน (Kinsella, 1976) ด้วยเหตุนี้การจับตัวกับน้ำมิใช่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโปรตีนเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับ pH และสารอื่นๆที่สามารถจับตัวกับโปรตีนได้ด้วย โปรตีนแต่ละชนิดสามารถจับตัวกับน้ำได้ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับกรดอะมิโนที่ประกอบกันเป็นโปรตีนนั้น โปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่มีขั้วจำนวนมากจะจับตัวกับน้ำได้ดีและโปรตีนที่มีกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้ว (hydrophobicity) ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนของจำนวนกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วต่อกรดอะมิโนที่มีอยู่ทั้งหมดในโปรตีน อย่างไรก็ตามโปรตีนจะซ่อนส่วนที่ไม่มีขั้วไว้ภายในโครงสร้างตติยภูมิ (Pomeranz, 1991)

จากการศึกษาของ Knuckles และ Kohler (1982) ซึ่งศึกษาจากโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาที่ได้จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และแบบพ่นลมร้อน เปรียบเทียบกับ soy protein isolate พบว่า fat binding capacity ของโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาจะสูงกว่า soy protein isolate และโปรตีนจากใบอัลฟัลฟาจะมีค่า fat binding capacity สูงที่สุด เมื่อผ่านวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

สำหรับ water binding capacity ของ LPC ชนิดทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและแบบพ่นลมร้อนที่มี outlet temperature 85 °C มีค่าเป็น 0 นั้น เพราะว่าในโครงสร้างของ LPC มีความเป็น hydrophobic มาก ทำให้การดูดซึมน้ำทำได้ไม่ดี ในขณะที่ 140 °C มี fat binding capacity ที่ไม่ดี (hydrophillic มาก) แต่กลับมี water binding capacityดี และเมื่อเปรียบเทียบกับ soy protein isolate พบว่า soy protein isolate จะมี water binding capacity มากกว่าก็เพราะว่ามีความเป็น hydrophillic มากกว่านั่นเอง (Knuckles และ Kohler, 1982)

ความสามารถในการละลาย (solubility)

โปรตีนมีโมเลกุลขนาดใหญ่ เมื่อใส่ลงในน้ำจะไม่เกิดสารละลายอย่างแท้จริง แต่จะเป็นคอลลอยด์ นักวิทยาศาสตร์มักใช้คำว่าการละลายกับโปรตีน ดังนั้นเมื่อมีผู้กล่าวว่าโปรตีนละลายน้ำ จึงมีความหมายว่าโปรตีนกระจายในน้ำ การละลายน้ำของโปรตีนขึ้นอยู่กับ pH กำลังไอโอนิก (ionic strength) และอุณหภูมิ โปรตีนจะละลายน้ำได้น้อยที่สุดที่จุดไอโซอิเลกตริก (IP) แต่จะละลายได้ดีขึ้นถ้า pH ห่างจากจุดนี้ออกไป ที่จุด IP โมเลกุลโปรตีนจะมีประจุบวกเท่ากับประจุลบ แรงผลักกันระหว่างโมเลกุลจึงไม่มี แต่ถ้า pH สูงหรือต่ำกว่า IP โปรตีนจะมีประจุลบ หรือประจุบวกจึงผลักกันไม่สามารถเข้าใกล้กันได้ (Fennema, 1996)

เกลือที่มีคุณสมบัติเป็นกลางจะมีผลต่อการละลายของโปรตีนมาก ถ้าค่อยๆ เพิ่มปริมาณเกลือในอาหารให้มากขึ้นการละลายของโปรตีนจะเพิ่มขึ้นและการเพิ่มการละลายนี้จะสูงขึ้นอีกถ้าเกลือที่ใช้ให้อนุมูลที่มีประจุบวกมากกว่าหนึ่ง เช่น $MgCl_2$ หรือ $MgSO_4$ จะมีประสิทธิภาพสูงกว่า NaCl KCl หรือ NH_4Cl แต่ถ้าปริมาณเกลือที่ให้สูงเกินไปการละลายจะเริ่มลดลงและถ้าปริมาณเกลือสูงถึงจุดหนึ่งโปรตีนจะตกตะกอนทั้งหมด (Kinsella, 1976)

การละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถ้าอาหารมีอุณหภูมิระหว่าง 40-50 °C โปรตีนจะเริ่มไม่อยู่ตัวและเริ่มเปลี่ยนสภาพ และถ้าอุณหภูมิสูงถึงจุดหนึ่งโปรตีนจะตกตะกอนทั้งหมด (ฉรงค์ นิยมวิทย์, 2538)

การเปลี่ยนสภาพของโปรตีนมีความสำคัญมากในการแปรรูปอาหาร การเก็บและการนำไปใช้ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการเปลี่ยน pH การให้ความร้อน การใช้ตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์และการใส่สารอินทรีย์บางชนิด คำว่าการเปลี่ยนสภาพของโปรตีน (denaturation) หมายถึงการเปลี่ยนโครงสร้างทุติยภูมิโครงสร้างตติยภูมิและโครงสร้างจตุรภูมิโดยไม่ทำให้สมบัติการใช้งานของโปรตีนเปลี่ยนไป ผลการเปลี่ยนสภาพทำให้โปรตีนมีสัดส่วนของกรดอะมิโนไม่มีขั้วสูงขึ้น เนื่องจากโมเลกุลโปรตีนได้ยืดออก การละลายของโปรตีนจะลดลง (Kinsella, 1976; Pomeranz, 1991) ส่วนจะลดลงมากน้อยเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ได้รับความร้อนนั้นๆ ขนาดโมเลกุลของโปรตีนขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาระหว่างกลุ่มที่ไม่มีขั้วและการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ สำหรับพันธะไดซัลไฟด์นั้นจะเกิดขึ้นเมื่อสารละลายโปรตีนมีความเข้มข้นสูง เมื่อเกิดพันธะไดซัลไฟด์สารละลายจะเปลี่ยนเป็นเจล คำว่า gelation มักใช้กับการเกิดเจลที่สานตัวกันอย่างมีระเบียบพอสมควร ส่วนคำว่า coagulation จะใช้กับการเกิดเจลที่สารตัวกับแบบไม่มีระเบียบมากนัก อัตราความเร็วของการเกิดเจลจะเป็นตัวกำหนดโครงสร้างของเจล (Pomeranz, 1991)

I17986461

ความสามารถในการละลายของโปรตีนจากใบยาสูบจะสามารถวัดได้ในรูป nitrogen solubility ซึ่งการตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีต่างกันจะได้ตะกอนโปรตีนมีความสามารถในการละลายต่างกันไป เช่น การใช้กรดและความร้อนในการตกตะกอนโปรตีนก็จะมีโปรตีนที่มีความสามารถในการละลายแตกต่างกัน งานวิจัยของ Betschart (1974) ได้ศึกษา nitrogen solubility จาก alfalfa leaf protein concentrate พบว่า nitrogen solubility จะแตกต่างกัน ซึ่ง nitrogen solubility ของโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยความร้อน จะมีความสามารถในการละลายต่ำมากจนแทบไม่ละลายไม่ว่าที่ pH เท่าใด ซึ่งถือว่าเป็นข้อจำกัดสำหรับการนำโปรตีนชนิดนี้ไปใช้ในขณะที่การใช้กรดตกตะกอนโปรตีน พบว่า การละลายจะต่ำที่สุดที่ pH 4 ซึ่งเป็นจุด IP และการละลายจะสูงขึ้นที่ pH ก่อนและหลังจุด IP นี้ ที่ pH 2 และ 9 โปรตีนจะมีความสามารถละลายได้ในรูปไนโตรเจนที่ละลายได้ (nitrogen solubility) ประมาณ 55-60 % และที่ pH 10 จะละลายได้ถึง 98 %

Knuckles และ Kohler (1982) ศึกษาความสามารถในการละลายของโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาที่ผ่านการทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตราฟิวเตรชัน และทำแห้งโดยวิธีพ่นลมร้อนและทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเปรียบเทียบกัน โดยวิธีพ่นลมร้อนจะใช้ outlet temperature 85 95 และ 140 °C พบว่าโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาจะละลายได้มากเมื่อทำแห้งโดยวิธีพ่นลมร้อนที่อุณหภูมิ outlet temperature ต่ำ คือ ที่ 85 °C ซึ่งจะมีความสามารถในการละลายของโปรตีนใกล้เคียงกับโปรตีนที่ทำแห้งโดยวิธีแบบแช่เยือกแข็งและโปรตีนที่ทำแห้งโดยวิธีพ่นลมร้อนที่ outlet temperature 95 และ 140 °C จะมีความสามารถในการละลายลดลงตามลำดับ และจากรายงานการวิจัยยังกล่าวว่าการใช้วิธีการทำแห้งแบบพ่นลมร้อนที่อุณหภูมิ outlet 140 °C จะยังคงมีความสามารถในการละลายที่สูงกว่าการตกตะกอนโปรตีนโดยการใช้ความร้อนโดยตรง (heat precipitation)

การเกิดอิมัลชั่น

เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าคุณสมบัติหลายประการของโปรตีนเกี่ยวข้องกับปริมาณของกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วในโมเลกุล สำหรับการทำให้เกิดอิมัลชั่นพบว่าเกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนไม่มีขั้วบนผิวของโมเลกุลเท่านั้น ไม่ได้เกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนไม่มีขั้วทั้งหมดในโมเลกุล ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดอิมัลชั่นเป็นผลมาจากการดูดซับโมเลกุลโปรตีนไว้บนผิวของเม็ดน้ำมัน กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วจะทำให้โปรตีนสามารถเกาะตัวอยู่บนผิวของเม็ดน้ำมันได้ โดยกรดอะมิโนชนิดนี้จะแทรกตัวเข้าไปอยู่บนผิวของเม็ดน้ำมันและหันส่วนที่มีขั้วจับกับน้ำ ฉะนั้นโปรตีนที่มีสัดส่วนของ

กรดอะมิโนไม่มีขั้วสูงจะทำให้เม็ดน้ำมันดูดซับได้มากอิมัลชั่นจึงเกิดได้ดี อย่างไรก็ตามที่โปรตีนที่จะทำหน้าที่เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีจะต้องละลายน้ำได้ดีด้วย (Pomeranz, 1991)

Knuckles และ Kohler (1982) ศึกษา emulisification property ได้แก่ emulsifying activity emulsion stability และ emulsifying capacity จากโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาที่ผ่านการทำให้เข้มข้น โดยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และแบบพ่นลมร้อน เปรียบเทียบกับ soy protein isolate พบว่า ทั้ง emulsifying activity (EA) และ emulsion stability (ES) ของทั้งโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟา และ soyprotein isolate มีค่าใกล้เคียงกัน และค่า EA ของ โปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาจะสูงกว่าของ soy protein isolate แสดงว่า กระบวนการที่ใช้ในการเตรียม โปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟา จะเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติน้อยกว่าและโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะมี EC สูงสุด และยังขึ้นกับอัตราส่วนระหว่าง hydrophobic/hydrophillic ของโมเลกุลโปรตีนที่สูญเสียสภาพธรรมชาติจากการใช้ความร้อนหรือกรดแล้วแต่กรณี

นอกจากนี้รายงานวิจัยของ Knuckles และ Kohler (1982) พบว่า การนำสารละลายโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟา (2 % w/v) มาผสมกับน้ำมัน จะได้อิมัลชันที่มีความหนืดสูง (1260 poise) และมีความเสถียรมาก และเมื่อเติมน้ำส้มสายชูและเครื่องเทศลงไปเพื่อทำเป็นมายองเนสจะพบว่ามีรสชาติและลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันเหมือนมายองเนสทั่วไป สามารถเก็บไว้ในตู้เย็นได้นานมากกว่า 3 เดือน โดยไม่เปลี่ยนแปลง

การเกิดโฟม

ความสามารถในการทำให้เกิดโฟมและการทำให้โฟมอยู่ตัวไม่มีความสัมพันธ์กับสัดส่วนของกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้วของโปรตีนมากนัก เป็นความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง (curvilinear relationship) กล่าวคือความสามารถในการทำให้เกิดโฟมของโปรตีนจะสูงขึ้นเมื่อสัดส่วนของกรดอะมิโนไม่มีขั้วมากขึ้นและความสามารถนี้จะเพิ่มขึ้นไม่มากนักเมื่อสัดส่วนของกรดอะมิโนไม่มีขั้วสูงมาก การทำให้เกิดโฟมและการทำให้โฟมอยู่ตัวเป็นผลมาจากความหนาแน่นของประจุบนโมเลกุลและความสามารถในการเพิ่มความหนืดของโปรตีน การทำให้โปรตีนเปลี่ยนสภาพโดยใช้ความร้อนจะทำให้อาหารเกิดโฟมได้ดีขึ้น ถ้าโปรตีนนั้นมีสัดส่วนของกรดอะมิโนไม่มีขั้วสูงมากพอ การใช้ความร้อนทำให้สัดส่วนของกรดอะมิโนไม่มีขั้วสูงขึ้น แต่การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้ไม่ใช่เป็นสาเหตุที่แท้จริงให้อาหารเกิดโฟมได้ดีขึ้น สาเหตุที่แท้จริงก็คือการตกตะกอนของโปรตีน เพราะการตกตะกอนทำให้ผนังของฟองแข็งตัว ความอยู่ตัวของโฟมจึงเพิ่มขึ้นและทำให้เกิดฟองมาก (Pomeranz, 1991)

Betschart (1974) ได้เสนอแนะว่าโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอัลฟัลฟา สามารถให้สมบัติในการเกิดโฟมที่ดีรวมทั้งให้เนื้อสัมผัสและสามารถทำให้อาหารขึ้นฟูได้ดี

Knuckles และ Kohler (1982) ศึกษาความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาเปรียบเทียบกับไข่ขาวแช่แข็ง พบว่าโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นลมร้อนโดยมี outlet temperature 85 °C จะได้ปริมาณของโฟมเป็น 10 เท่า ของปริมาตรสารละลาย ซึ่งจะเท่ากับการใช้ frozen-thawed egg white หลังจากเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง foam stability จะมีความเสถียรมากกว่าโปรตีนจากไข่ขาว นอกจากนี้ ปริมาตรของโฟมและความเสถียรของโฟม จะถูกรบกวนได้ด้วยค่า ด้วยความเป็นกรดด่าง ซึ่งเมื่อ pH มากกว่า 6 ปริมาตรโฟมจะลดลง และจะมีความเสถียรดีที่ pH 4.5 คือจะมีปริมาตร 89 % (จากเดิม 100 %) และพบว่าโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาจะมี foaming capacity สูงกว่าไข่ขาว เคซีน และโปรตีนจากถั่วเหลือง เนื่องจากโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟามีโมเลกุล ที่มีขนาดใหญ่และสายโพลีเปปไทด์ที่ยาวกว่าโปรตีนชนิดอื่นทำให้โฟมมีขนาดใหญ่และเสถียรกว่า

จากสมบัติในการเกิดโฟมที่ดีทำให้มีการนำไปเปรียบเทียบกับไข่ขาวโดยการนำไปทำผลิตภัณฑ์ meringue พบว่าโฟมจากโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาจะมีความเสถียรที่ดีในขณะอบ แต่จะมีความแตกต่างไปจากไข่ขาวซึ่งจะเห็นได้ชัดเจน แต่เมื่อนำมาผสมกันจะไม่มีความแตกต่างไปจากการใช้ไข่ขาวเพียงอย่างเดียวมากนัก และจากการทดลองใช้ผู้บริโภคทดสอบ 12-15 คน พบว่า ผู้บริโภคทั้ง 12-15 คน ยอมรับได้ ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาสามารถนำมาเป็น ส่วนผสมของไข่ขาว เพื่อทดแทนปริมาณไข่ขาวเพื่อลดต้นทุนการผลิตได้ดี

จะเห็นว่าสมบัติการใช้งานของโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟามีประสิทธิภาพดี ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเพื่อส่งเสริมสมบัติการใช้งานของอาหารได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้นอกจากโปรตีนเข้มข้นจากใบอัลฟัลฟาแล้วโปรตีนเข้มข้นจากใบ พืชชนิดต่างๆ ก็มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันอีกด้วย (Knuckles และ Kohler, 1982)