รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง
ปริมาณและการสังเคราะห์วิตามินบี 1 ของข้าวไทยและกิจกรรมของเอนไซม์ Thiamine phosphate phosphorylase ในระหว่างการเจริญของเมล็ดข้าว
(The extent and synthesis of vitamin B1 in thai rice seeds and the activity of Thiamine phosphate phosphorylase during seed development)

หัวหน้าโครงการวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ
ผู้ร่วมโครงการวิจัย: นางเกศราภรณ์ จันทร์ประเสริฐ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802393
สัญญาเลขที่ 83/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง
ปริมาณและการสังเคราะห์วิตามินบี 1 ของข้าวไทยและกิจกรรมของเอนไซม์ Thiamine phosphate phosphorylase ในระหว่างการเจริญของเมล็ดข้าว
(The extent and synthesis of vitamin B1 in thai rice seeds and the activity of Thiamine phosphate phosphorylase during seed development)

หัวหน้าโครงการวิจัย: **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ**
ผู้ร่วมโครงการวิจัย: **นางเกศราภรณ์ จันทร์ประเสริฐ**
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

พฤศจิกายน 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 83/2558

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการดำเนินการวิจัย

ขอบคุณ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ อาจารย์ ดร.ณมนรัก คำฉัตร และอาจารย์อรรถกร คำฉัตร ที่เอื้อเฟื้อเมล็ดข้าวพื้นเมือง ขอบคุณนางสาวมณฑนี โพธิ์แสง ที่ได้ช่วยสละเวลาแรงงานและร่วมคิดจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วง ขอบคุณคุณชาติชาย มาลาพงษ์ ที่ช่วยสนับสนุนทางเทคนิคปฏิบัติการ

ปริมาณและการสังเคราะห์วิตามินบี 1 ของข้าวไทยและกิจกรรมของเอนไซม์ Thiamine phosphate phosphorylase ในระหว่างการเจริญของเมล็ดข้าว

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณและการสังเคราะห์วิตามินบี 1 (ไทอะมีน thiamine) และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine phosphate phosphorylase (HMPK/TPP) ของข้าวไทย ซึ่งจากการวิเคราะห์หาปริมาณไทอะมีนโดยวิธีทางสเปคโตรโฟโตเมตรี พบว่า ข้าวไทย 30 พันธุ์ มีความผันแปรของปริมาณไทอะมีนอยู่ระหว่าง 0.144-0.447 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยมีไทอะมีนรวมเฉลี่ยเท่ากับ 0.274 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ข้าว 5 พันธุ์ ได้แก่ กข7 กข15 กข23 กข41 และกข43 มีปริมาณไทอะมีนสูงที่สุด ส่วนข้าวพันธุ์ กข11 กข 31 และพิษณุโลก2 จัดอยู่ในกลุ่มข้าวที่มีปริมาณไทอะมีนต่ำที่สุด โดยข้าวที่มีปริมาณไทอะมีนต่ำที่สุดมีปริมาณไทอะมีนต่ำกว่าพันธุ์ที่มีสูงที่สุดประมาณ 3 เท่า จากการทดลองดังกล่าวได้คัดเลือกข้าวจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ ได้แก่ กลุ่มที่มีไทอะมีนสูง (กข41 และ กข43) กลุ่มที่มีไทอะมีนปานกลาง (สุพรรณบุรี 1 และ กข29) และกลุ่มที่มีปริมาณไทอะมีนต่ำ (กข11 และพิษณุโลก 2) เพื่อนำมาศึกษาปริมาณไทอะมีนในแต่ระระยะการเจริญของดอกและผล โดยเก็บตัวอย่างในระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่า และระยะเก็บเกี่ยว พบว่าเมื่อเมล็ดมีพัฒนาการการสะสมไทอะมีนในเมล็ดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย ในระยะดอกบานมีปริมาณไทอะมีนน้อยที่สุด และหลังจากนั้นจึงมีการสร้างและสะสมปริมาณไทอะมีนเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนม จากนั้นจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนถึงระยะเก็บเกี่ยวซึ่งเป็นระยะที่พบปริมาณของไทอะมีนมากที่สุดในข้าวพันธุ์ กข41 กข43 สุพรรณบุรี 1 กข29 และกข11 ส่วนพันธุ์พิษณุโลก 2 มีปริมาณไทอะมีนสูงที่สุดในระยะน้ำนม และมีปริมาณลดลงในระยะข้าวเม่าจากนั้นปริมาณจะคงที่จนกระทั่งถึงระยะเก็บเกี่ยว ทั้งนี้พบว่าโปรตีน Thiamine phosphate phosphorylase (TPP) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ 2 หน้าที่ คือ Hydroxymethylpyrimidine kinase (HMPK) และ TPP ดังนั้นเพื่อให้การวัดกิจกรรมสอดคล้องกับการทำงานในเนื้อเยื่อจริง จริงทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในการทำหน้าที่ทั้งสองอย่างพร้อมกัน คือ HMPK/TPP พบว่า ในเมล็ดข้าวที่ระยะการพัฒนาของเมล็ดทั้ง 4 ระยะ พบว่า ในระยะดอกบานกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP น้อยที่สุด และมีกิจกรรมสูงขึ้นและสูงที่สุดในระยะข้าวเม่าจากนั้นลดลงในระยะเก็บเกี่ยว เมื่อเปรียบเทียบในข้าวทั้ง 6 พันธุ์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP มีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งแต่ละระยะมีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยในข้าว 6 พันธุ์ เท่ากับ 0.14, 0.24, 0.32 และ 0.28 นาโนโมลไทอะมีน/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการวิจัยทำให้เห็นความเป็นไปได้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถในการสร้างและสะสมไทอะมีนเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

คำสำคัญ: ไทอtมีน, วิตามินบี 1, การพัฒนาของเมล็ด, ข้าว, Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine phosphate phosphorylase

The extent and synthesis of vitamin B1 in thai rice seeds and the activity of Thiamine phosphate phosphorylase during seed development

Abstract

The objectives of this research are to investigate the extent and biosynthesis of vitamin B1 (thiamine) in thai rice grain and to consider the activity of Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine phosphate phosphorylase (HMPK/TPP) during grain development. The determination of thiamine in 30 cultivars of Thai rice by spectrophotometry method showed the variation between 0.144-0.447 mg/ 100 g. The statistical analysis revealed that RD7, RD15, RD23, RD 41, and RD43 had highest thiamine contend among 30 Thai rice cultivars. RD11, RD13 and PSL2 had the lowest thiamine content. The lowest thiamine cultivar had 3 times lower than the highest thiamine cultivar. Six cultivars, RD41 and 43 for high thiamine cultivars, SPR1 and RD29 for medium thiamine cultivars, and RD11 and PSL2 for low thiamine cultivars, were selected to study of thiamine during development of grain. Samples were collected at flowering, milky, dough, and harvesting stage. The results showed that RD41, RD43, SPR1, RD29, and RD11 had the highest thiamine in harvesting stage while PSL2 showed the highest content in milk stage and decreased afterward. The study of Thiamine phosphate phosphorylase (TPP) which is the bifunctional protein and can worked as Hydroxymethylpyrimidine kinase (HMPK). Thus, in this study was determined the activity of HMPK/TPP in the same reaction due to consider the actual activity within the cell. The activity of HMPK/TPP was lowest in the flowering stage, increased to the highest in dough stage and decreased afterward. The averages of HMPK/TPP activity from 6 cultivars were 0.14, 0.24, 0.32, and 0.28 nmole thiamine/min/mg protein, in flowering, milky, dough, and harvesting stage, respectively. However, this research showed the possibility to develop high thiamine content for the nutritious value of rice.

Keywords: thiamine, vitamin B1, grain development, rice, Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine phosphate phosphorylase

สารบัญ

		หน้า
	กิตติกรรมประกาศ	ง
	บทคัดย่อภาษาไทย	จ
	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
	สารบัญ	ช
	สารบัญภาพ	ฌ
	สารบัญตารางผนวก	ฎ
บทที่ 1	**บทนำ**	1
	วัตถุประสงค์	2
	ขอบเขตการวิจัย	2
	วิธีดำเนินการวิจัย	3
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	ความสำคัญและที่มาของปัญหา	5
	ข้าว	5
	ไทอะมีนและความสำคัญ	5
	การสังเคราะห์ไทอะมีน	7
	ปริมาณวิตามินบี 1 ในธัญพืชเปรียบเทียบกับข้าว	10
	เอนไซม์ Thiamine-phosphate pyrophosphorylase และกิจกรรม	15
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	17
	วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	17
	วิธีดำเนินการวิจัย	18
บทที่ 4	**ผลการวิจัย**	22
	การทดลองตอนที่ 1 การศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในข้าวไทย	22
	การทดลองตอนที่ 2 การศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในแต่ละระยะการเจริญของเมล็ด	25
	การทดลองตอนที่ 3 การศึกษากิจกรรมของโปรตีน Hydroxymethylpyrimidine kinase/ Thiamine-phosphate pyrophosphorylase (HMPK/TPP) ในระหว่างการเจริญของเมล็ด	28

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 5	**อภิปรายผลและสรุป**	36
	อภิปรายผล	36
	สรุป	41
	ข้อเสนอแนะ	41
บทที่ 6	**บรรณานุกรม**	42
	ภาคผนวก	47
	ประวัตินักวิจัย	66

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 2-1	บทบาทของไทอะมีนไดฟอสเฟตในวิถีเมตาบอลิซึม	7
ภาพที่ 2-2	กระบวนการสังเคราะห์ไทอะมีนและอนุพันธ์	9
ภาพที่ 2-3	โครงสร้างของไทอะมีนและอนุพันธ์	10
ภาพที่ 2-4	ปริมาณไทอะมีนในข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) สองพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Norin 61 (♦) และพันธุ์ Dekan (●)	11
ภาพที่ 2-5	การเปลี่ยนแปลงของไทอะมีนทั้งหมด (total thiamine; ●) ไทอะมีนอิสระ (free thiamine; ○) และไทอะมีนที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ (thiamine ester; ■) ในข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ Nipponbare	12
ภาพที่ 2-6	การเปลี่ยนแปลงของไทอะมีน (▲) และไทอะมีนฟอสเฟต (△) ในเมล็ดงาที่กำลังมีการพัฒนาหลังออกดอก	13
ภาพที่ 2-7	การเปลี่ยนแปลงของไทอะมีนและอนุพันธุ์ระหว่างพัฒนาการของเมล็ด (A) ข้าวสาลี (B) ข้าวทริทิเคลี (C) ข้าวไรน์ (D) ข้าวโอ๊ตและ (E) ข้าวบาร์เลย์ (F-J) แสดงไทอะมีนรวม	14
ภาพที่ 2-8	การเปลี่ยนแปลงของไทอะมีนในช่วงการพัฒนาของเมล็ดจากระยะดอกบานในข้าวสาลี (*Triticum aestivum)* สองพันธุ์ คือ พันธุ์ Norin 61 (◆) และพันธุ์ Dekan (●)	15
ภาพที่ 2-9	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนที่จับกับไทอะมีน (●) และการจับของไทอะมีนกับโปรตีน (■) ของเมล็ดงาระหว่างการพัฒนาหลังจากดอกบาน	15
ภาพที่ 4-1	ก) น้ำหนักข้าวเปลือก 100 เมล็ด และ ข) น้ำหนักข้าวกล้อง 1000 เมล็ด	23
ภาพที่ 4-2	ปริมาณไทอะมีนในเมล็ดข้าวกล้อง 30 พันธุ์	24
ภาพที่ 4-3	โครมาโตแกรมของไทอะมีน-ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่แยกภายใต้ HPLC ที่ใช้คอลัมน์ C-18 (Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18, 4.6x150 mm, 4 um Agilent) ใช้ 50 mM phosphate buffer pH 5.6 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 v/v เป็น mobile phase โดยควบคุมอัตราการไหลที่ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาทีและใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 233 nm	25

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 4-4	โครมาโตแกรมของสารสกัดเมล็ดข้าวด้วยน้ำกลั่น ที่แยกภายใต้ HPLC ที่ใช้คอลัมน์ C-18 (Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18, 4.6x150 mm, 4 um Agilent) ใช้ 50 mM phosphate buffer pH 5.6 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 v/v เป็น mobile phase โดยควบคุมอัตราการไหลที่ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาทีและใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 233 nm	26
ภาพที่ 4-5	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไทอะมีนระหว่างการพัฒนาของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์	27
ภาพที่ 4-6	จุดของสารที่ได้จากการสังเคราะห์และนำไปแยกโดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Dowex 50Wx8 hydrogen form บนแผ่น TLC ภายใต้แสง UV	28
ภาพที่ 4-7	ผลการวิเคราะห์จาก ^{1}H-NMR ของสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้	29
ภาพที่ 4-8	ผลการวิเคราะห์จาก ^{31}P-NMR ของสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้	29
ภาพที่ 4-9	ปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่เจริญในระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่า และระยะเก็บเกี่ยว	30
ภาพที่ 4-10	ความสัมพันธ์ของปริมาณไทอะมีนที่ถูกสร้างขึ้นหลังจากบ่มเป็นเวลา 0 2 4 และ 6ชั่วโมง โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 50 µM HMP, 50 µM HET-P, 10 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$ และสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดโปรตีนปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร	32
ภาพที่ 4-11	ความสัมพันธ์ของปริมาณไทอะมีนที่ถูกสร้างขึ้นหลังจากบ่มเป็นเวลา 0 2 และ 4 ชั่วโมง โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 50 µM HMP, 50 µM HET-P, 10 mM ATP, 10 mM MgCl2 และสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดโปรตีนปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร	32
ภาพที่ 4-12	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/ Thiamine-phosphate pyrophosphorylase (HMPK/TPP) ในเมล็ดข้าวที่พัฒนาในแต่ละระยะของข้าว 6 พันธุ์ เมื่อคำนวณต่อปริมาณโปรตีน	33
ภาพที่ 4-13	กิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine-phosphate pyrophosphorylase เฉลี่ยในข้าว 6 พันธุ์ที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 4-14	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/ Thiamine-phosphate pyrophosphorylase ในแต่ละระยะการพัฒนาของข้าว 6 พันธุ์ เมื่อคำนวณต่อเมล็ด	35
ภาพที่ 4-15	กิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine-phosphate pyrophosphorylase (HMPK/TPP) เฉลี่ยในข้าว 6 พันธุ์ที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด	35
ภาพที่ 5-1	ปริมาณไทอะมีนที่เพิ่มขึ้นจากระยะดอกบานถึงระยะเก็บเกี่ยว	39

สารบัญตารางผนวก

		หน้า
ตารางผนวกที่ 1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือก 1000 เมล็ดของข้าว 30 พันธุ์	48
ตารางผนวกที่ 2	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือก 1000 เมล็ดของข้าว 30 พันธุ์ ด้วยวิธี DMRT	48
ตารางผนวกที่ 3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักเมล็ดข้าวกล้อง 1000 เมล็ดของข้าว 30 พันธุ์	49
ตารางผนวกที่ 4	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเมล็ดข้าวกล้อง 1000 เมล็ดของข้าว 30 พันธุ์ ด้วยวิธี DMRT	49
ตารางผนวกที่ 5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไทอะมีนในข้าวกล้อง 30 พันธุ์	50
ตารางผนวกที่ 6	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไทอะมีนในเมล็ดข้าว 30 พันธุ์ ด้วยวิธี DMRT	50
ตารางผนวกที่ 7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไทอะมีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์	51
ตารางผนวกที่ 8	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของไทอะมีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว 3 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT	52
ตารางผนวกที่ 9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์	52
ตารางผนวกที่ 10	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีนในเมล็ดข้าว 6 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT	53
ตารางผนวกที่ 11	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของไทอะมีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าวด้วยวิธี DMRT	53
ตารางผนวกที่ 12	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อมิลลิกรัมโปรตีนในข้าว 6 พันธุ์ที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด	54
ตารางผนวกที่ 13	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อมิลลิกรัมโปรตีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดด้วยวิธี DMRT	54
ตารางผนวกที่ 14	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อมิลลิกรัมโปรตีนในเมล็ดข้าว 6 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT	55

สารบัญตารางผนวก (ต่อ)

		หน้า
ตารางผนวกที่ 15	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อเมล็ดในข้าว 6 พันธุ์ที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด	55
ตารางผนวกที่ 16	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อเมล็ดในข้าว 6 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT	56
ตารางผนวกที่ 17	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อเมล็ดในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดด้วยวิธี DMRT	56

บทที่ 1
บทนำ

ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย และประชากรโลกอย่างน้อยอีกกว่า 50 เปอร์เซ็นต์บริโภคข้าวเป็นอาหารหลักเช่นกัน รวมทั้งการบริโภคข้าวในประเทศตะวันตกก็มีแนวโน้มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการแข่งขันทางการตลาดในการค้าโลกก็มีความเข้มข้นมากขึ้น ดังนั้นการพัฒนาพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีลักษณะที่ดี มีเอกลักษณ์และตลาดต้องการจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อให้การพัฒนาพันธุ์ข้าวประสบความสำเร็จ การศึกษาลักษณะที่ต้องการของพันธุ์ข้าวในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เป็นสิ่งสำคัญ เพื่อใช้ลักษณะที่ดีนั้นในการเพิ่มศักยภาพพันธุ์ข้าว เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีคุณลักษณะที่ดีเด่นและเป็นไปตามความต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์ข้าว

ข้าวเป็นพืชที่เป็นแหล่งสำคัญของวิตามินบี 1 (ไทอะมีน, thiamine) ซึ่งเป็นวิตามินที่ละลายน้ำได้และมีความจำเป็นต่อมนุษย์ เนื่องจากมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ไทอะมีนได้ ซึ่งวิตามินนี้มีรายงานทางการแพทย์ว่ามีส่วนช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบประสาท มีบทบาทเกี่ยวกับการสลายคาร์โบไฮเดรต การสังเคราะห์พลังงานเคมี (ATP) และการสังเคราะห์กรดนิวคลิอิก (nucleic acid) อย่างไรก็ตามในประเทศที่พัฒนาแล้วและประเทศกำลังพัฒนาไม่มีรายงานการขาดวิตามินบี 1 แต่เนื่องจากกระแสการรักษ์สุขภาพ ทำให้มีการรับประทานวิตามินบี 1 เป็นอาหารเสริม และตลาดด้านอาหารสุขภาพกำลังขยายตัวอย่างมาก ดังนั้นการเพิ่มมูลค่าข้าวด้วยการปลูกเพื่อเน้นการเพิ่มคุณภาพของข้าวโดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามินบี 1 ซึ่งเป็นวิตามินที่พบได้มากในธัญพืชจึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่ง

เมล็ดข้าวมีปริมาณวิตามินบี 1 ประมาณ 0.25 มิลลิกรัม/100 กรัม ในขณะที่ธัญพืชอื่น เช่น ข้าวบาร์เลย์ มีปริมาณวิตามินบี 1 สูงกว่า (0.35 มิลลิกรัม/100 กรัม) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้เห็นได้ว่า อาจเป็นไปได้ว่าเราสามารถเพิ่มปริมาณวิตามินบี 1 ในเมล็ดข้าวได้ แต่ข้อมูลนี้เป็นข้อมูลที่ศึกษามาจากข้าวเพียงหนึ่งพันธุ์เท่านั้น ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ อาจมีการสร้างและสะสมวิตามินบี 1 ในปริมาณต่างกัน และการที่จะพัฒนาพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีการสะสมวิตามินบี 1 ในปริมาณสูงได้นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาแหล่งพันธุ์ที่ดีเพื่อให้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผสมพันธุ์ต่อไป

กระบวนการสังเคราะห์ไทอะมีนในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในพืชยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้โครงสร้างของไทอะมีน ประกอบด้วย 2 ส่วนได้แก่ วงแหวนไทแอโซล (thiazole) และวงแหวนไพริมีดีน (pyrimidine) เชื่อมต่อกันด้วยหมู่เมทิลีน (methylene bridge) ซึ่งทั้งสองส่วนนี้จะรวมกันโดยการทำงานของเอนไซม์ Thiamine-phosphate pyrophosphorylase (TPP) ซึ่งมีรายงานว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่เร่งปฏิกิริยาได้ 2 ปฏิกิริยา (bifunctional protein) โดยอีกหน้าที่หนึ่งคือ Hydroxymethylpyrimidine kinase (HMPK) การเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน 4-amino-2 methyl-5-

hydroxymethylpyrimidine monophosphase (HMP-P) hydroxymethylpyrimidine pyrophosphase (HMP-PP) ซึ่ง Rapala-Kozik *et al.* (2007) รายงานว่า ในข้าวโพด (*Zea mays*) มีกิจกรรมของ TPP เป็น 2.46 nmol TMP/min/mg protein แต่เมื่อศึกษากิจกรรมของ HMPK/TPP พบว่ามีกิจกรรมเพียง 0.22 nmol TMP/min/mg protein รวมทั้งยังไม่พบการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์นี้ในข้าว ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP เนื่องจากการหากิจกรรมของโปรตีนในหน้าที่ใดหน้าที่หนึ่งค่าที่ได้อาจไม่สะท้อนถึงการทำงานของเอนไซม์จริงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของข้าว

งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยขั้นต้นที่จะหาปริมาณวิตามินบี 1 และกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ในพันธุ์ข้าวไทย เพื่อสามารถนำพันธุ์ที่มีลักษณะดีมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีเอกลักษณ์พิเศษ คือ มีปริมาณวิตามินบี 1 สูง ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในข้าวไทย
2. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine-phosphate pyrophosphorylase (HMPK/TPP) กับการสังเคราะห์วิตามินบี 1 ในเมล็ดข้าวในระยะต่าง ๆ

ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในข้าวกล้องของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกในสภาพเดียวกัน จำนวน 30 พันธุ์
2. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine-phosphate pyrophosphorylase โดยศึกษาที่ระยะเริ่มออกดอก ระยะข้าวน้ำนม ระยะข้าวแม่า และระยะเก็บเกี่ยว

วิธีดำเนินการวิจัย

ปลูกข้าว จำนวน 30 พันธุ์

↓

นำเมล็ดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไทอะมีนรวมโดยวิธีการทางสเปกโตโฟโตเมตรี

↓

การคำนวณหาปริมาณไทอะมีนและการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการทางสถิติ

↓

คัดเลือกข้าวจำนวน 6 พันธุ์จาก 30 พันธุ์

↓

ปลูกข้าว 6 พันธุ์
เก็บตัวอย่างในระยะดอกบาน น้ำนม ข้าวเม่า และระยะเก็บเกี่ยว

↓

วิเคราะห์หาปริมาณไทอะมีนรวมโดย HPLC

↓

สกัดและวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

↓

หากิจกรรมของเอ็นไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine-phosphate pyrophosphorylase

↓

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการทางสถิติ สรุปผลและรายงานผล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 ด้านวิชาการ ได้ข้อมูลปริมาณวิตามินบี 1 ในพันธุ์ข้าวต่าง ๆ ของไทย รวมทั้งความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมที่สำคัญในกระบวนการสร้างไทอะมีนในข้าว ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาพันธุ์ข้าวต่อไป

2 ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ จากข้อมูลที่ได้อาจนำไปสู่การผลิตข้าวที่มีวิตามินบี 1 สูง และเป็นการเพิ่มมูลค่าข้าวไทยได้อีกทางหนึ่ง

3 ด้านสังคมและชุมชน จากข้อมูลที่ได้อาจเป็นทางเลือกแก่ประชาชนในการตัดสินใจเลือกบริโภคข้าวที่มีปริมาณวิตามินบี 1 สูง ในอีกแง่หนึ่งเป็นการส่งเสริมสุขภาพของประชาชนโดยอ้อมอีกด้วย

4 เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป ข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่ความเข้าใจในการสร้างวิตามินบี 1 ในข้าวไทย และสามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อหาปัจจัยที่ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างวิตามินบี 1 ในข้าว รวมทั้งการทราบว่าเมล็ดข้าวที่เจริญในระยะใดจะมีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด ทำให้สามารถกำหนดช่วงเวลาที่จะทำการศึกษาการเพิ่มปริมาณวิตามินบี 1 ในข้าวได้ นอกจากนี้การได้พันธุ์ข้าวที่มีวิตามินบี 1 สูงจะนำไปสู่การใช้เป็นต้นพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างข้าวพันธุ์ใหม่ที่มีวิตามินบี 1 สูงต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชล้มลุกจัดอยู่ในวงศ์ Poaceae พบการกระจายทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น เมล็ดข้าว ประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ แกลบ (husk) และผลหรือข้าวกล้อง (brown rice) ที่ประกอบด้วย เอ็มบริโอ (จมูกข้าว) รำและเอนโดสเปิร์ม (แป้ง) ร้อยละ 2, 6 และ 92 ตามลำดับ ข้าวเป็นอาหารหลักสำหรับคนไทยและประชากรในทวีปเอเชีย ในบางประเทศข้าวเป็นอาหารที่ให้พลังงานคิดเป็นสัดส่วนถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของพลังงานที่ได้รับจากอาหารทั้งหมด (Dawe, 2000) นอกจากข้าวจะเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่ให้พลังงานเป็นหลักแล้ว ข้าวยังมีสารอาหารอื่นอีกด้วย เช่น วิตามิน บี 1 บี 2 วิตามินอี แคลเซียม โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุ (ผาณิต และคณะ, 2555) โดยเฉพาะวิตามินบี 1 ที่มีรายงานว่าข้าวเป็นแหล่งที่ให้วิตามินบี 1 ที่ดีแหล่งหนึ่ง โดยที่วิตามินและธาตุอาหารต่าง ๆ ของข้าวอยู่ส่วนของเอ็มบริโอและเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นหลัก (Buchholz *et al.*, 2012) ดังนั้นข้าวขัดขาวที่ขัดเอาส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดและเอ็มบริโอออกจนหมดเหลือเพียงเอ็นโดสเปิร์มที่เก็บสะสมแป้งจึงทำให้ข้าวขัดขาวมีวิตามินเหลืออยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากรายงานของ Zheng and Chen (2017) พบว่าข้าวที่ผ่านการขัดสีสูญเสียไทอะมีนไปถึง 80-90% เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวกล้อง

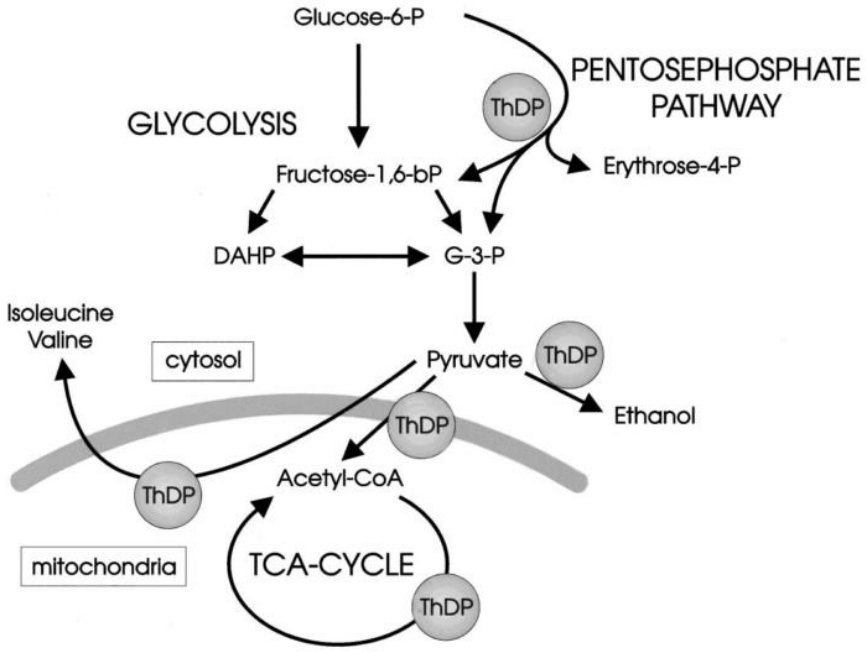
ไทอะมีนและความสำคัญ

วิตามินบี 1 หรือ ไทอะมีน (thiamine) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์ เช่น สำคัญต่อเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ไทอะมีนเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์โคเอนไซม์ไทอะมีนไดฟอสเฟต (thiamine diphosphate) (หรือไทอะมีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate)) โดยอาศัย ATP (Champe *et al.*, 2008) ซึ่งเป็นรูปที่เป็นประโยชน์ต่อเมตาบอลิซึม พบว่า 95-98 % ของไทอะมีนในร่างกายมนุษย์ อยู่ในรูปอนุพันธุ์ของไทอะมีน (Aguilar *et al.*, 2008) และเนื่องจากร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินชนิดนี้ได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยการรับประทานเพื่อรับวิตามินนี้เข้าสู่ร่างกายและดูดซึมผ่านทางลำไส้เล็ก และส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย พบได้มากที่บริเวณหัวใจ ตับ ไต รวมทั้งสมอง (Sriram *et al.*, 2012) มีรายงานว่าแต่ละคนควรได้รับไทอะมีนประมาณ 1.2 มิลลิกรัมต่อวัน ทั้งนี้พบว่าประชากรที่มีการบริโภคข้าวที่ผ่านการขัดสีเป็น

หลักมีความเสี่ยงในการเกิดอาการขาดไทอะมีน (Goyer, 2010) นอกจากนี้ไทอะมีนยังสลายไปกับการล้างและการให้ความร้อนด้วยจากการประกอบอาหารด้วย

ไทอะมีนมีบทบาทในการเป็นโคเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิสมของคาร์โบไฮเดรต (Sriram *et al.*, 2012)โดยเฉพาะการสร้างสารตัวกลางในวิถีไกลโคไลซีส การสังเคราะห์พลังงานทางเคมีในรูปของ NADH, NADPH และ ATP รวมถึงการสังเคราะห์น้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรมรวมถึง (Rapala-Kozik, 2011) เกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในพืชซึ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสง (Tunc-Ozdemir *et al.*, 2009) รูปที่พร้อมทำงานเป็นโคเอนไซม์ของไทอะมีนคือไทอะมีนไดฟอสเฟต (ThDP) จะทำงานร่วมกับเอนไซม์ในหลาย ๆ ชนิด เช่น เอ็นไซม์ไพรูเวทดีไฮโดรจีเนส (pyruvate dehydrogenase) ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไพรูเวต (pyruvate) จากกระบวนการไกลโคไลซิสเป็นแอซิทิลโคเอ (acetyl-CoA) เอ็นไซม์ไพรูเวทดีคาร์บอกไซเลส (pyruvate decarboxylase) ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไพรูเวตเป็นอะซิทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) ในกระบวนการหมักน้ำตาลของยีสต์หรือในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เอ็นไซม์แอฟา-คีโตกลูตาเรท ดีไฮโดรจีเนส (α-ketoglutarate dehydrogenase) เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลฟาคีโทกลูทาเรต (α-ketoglutarate) เป็นซักซินิลโคเอ (succinyl CoA) ในวัฏจักรเครบส์ และปฏิกิริยาการเปลี่ยนไรโบส-5-ฟอสเฟต (ribose-5-phosphate) เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวิถีไกลโคลิซิส กระบวนการสร้าง aromatic amino acids ในวิถีเพนโทสฟอสเฟต (Hohmann & Meacock, 1998) ซึ่งกระบวนการนี้ไทอะมีนไดฟอสเฟตมีส่วนในการสร้างน้ำตาลไรโบสและ NADP (ภาพที่ 2-1)

ไทอะมีน มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการทำงานของเนื้อเยื่อและระบบประสาท (Ba, 2008) เนื่องจากเมื่อร่างกายได้รับไทอะมีนจะมีกระบวนการเปลี่ยนเป็น TDP ซึ่งมีส่วนสำคัญเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณประสาทไปตามเส้นใยประสาท และมีความสำคัญในการสังเคราะห์อะเซทิลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาททำให้ผู้ที่ขาดไทอะมีนมีอาการทางระบบประสาท เช่น เหน็บชา รวมทั้งมีอาการเบื่ออาหารและอ่อนล้า เป็นต้น (Roje, 2007; นภา หลิมรัตน์, 2555)



ภาพที่ 2-1 บทบาทของไทอะมีนไดฟอสเฟตในวิถีเมตาบอลิซึม
(ที่มา Hohmann & Meacock, 1998)

Sriram *et al.* (2012) รายงานว่ามีการใช้วิตามินบี 1 ในการบำบัดอาการต่าง ๆ ด้วย เช่น บำบัดผู้ต้องการเลิกสุรา บำบัดผู้ที่กำลังลดความอ้วน ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนไต นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีการใช้วิตามินบี 1 ในการบำบัดผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเลือดคั่งในหัวใจ (congestive heart failure)

การสังเคราะห์ไทอะมีน

โครงสร้างของไทอะมีน ประกอบด้วยวงแหวนไทแอโซล (thiazole) และวงแหวนไพริมีดีน (pyrimidine) เชื่อมต่อกันด้วยหมู่เมทิลีน (methylene bridge) ดังนั้นจึงอาจแบ่งวิถีการสังเคราะห์ได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่ การสังเคราะห์วงแหวนไทแอโซล และ การสังเคราะห์วงแหวนไพริมีดีน จากนั้นจึงเกิดการรวมกันได้ไทอะมีนไดฟอสเฟต (Roje, 2007) ดังนี้ (ภาพที่ 2-2)

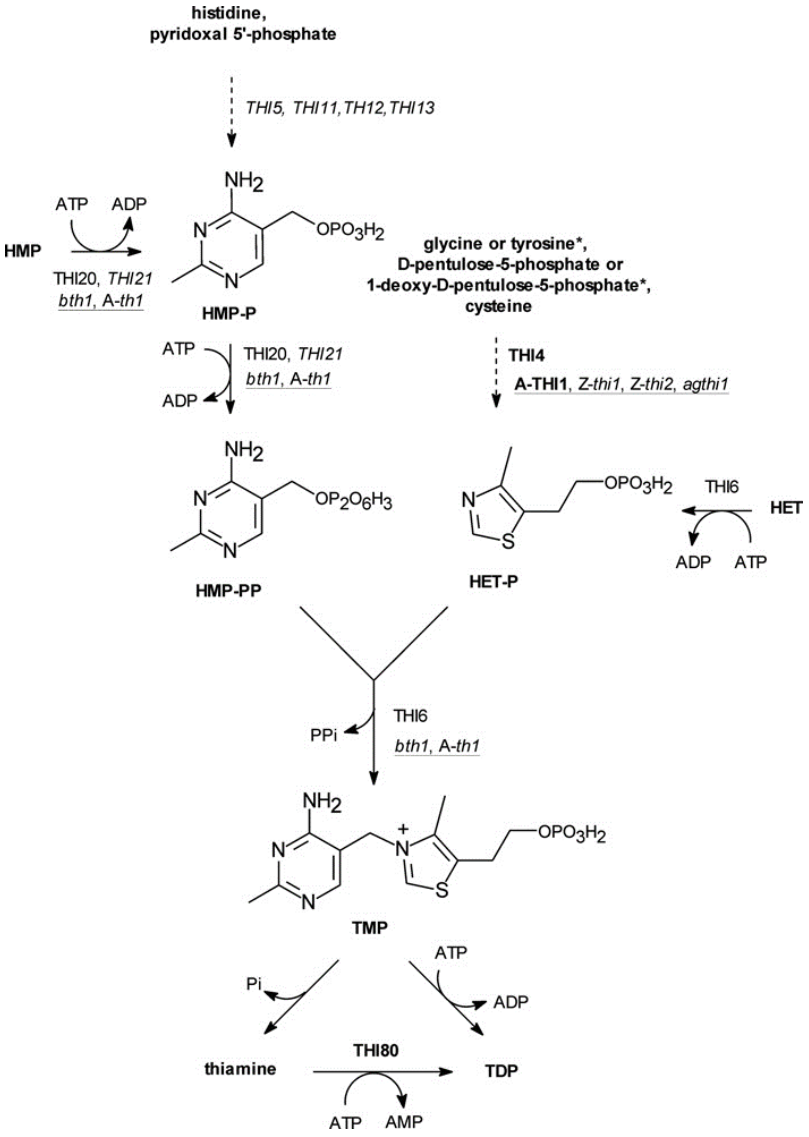
<u>การสังเคราะห์วงแหวนไทแอโซล</u> วงแหวนไทแอโซลในพืชสังเคราะห์จาก นิโคตินาไมด์ไดนิวคลิโอไทด์ กรดอะมิโนไกลซีนและซิสทีน (Chatterjee *et al.*, 2007) และในยีสต์สังเคราะห์จาก 2-pentulose-5-phosphate กรดอะมิโนไกลซีนหรือไทโรซีนและซิสทีน (Hohmann & Meacock, 1998) ได้เป็นโครงสร้างของไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต (4-methyl-5-β-hydroxyethylthiazole phosphate; HET-P) โดยเอนไซม์ไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟตซินเทส (HET-P synthase) ที่

ถอดรหัสจากยีน *THI1* ในอะราบิดอฟซิสและ หรือยีน *THI4* ในยีสต์ (Goyer, 2010) ข้าวโพด (Rapala-Kozik *et al.*, 2007) และข้าว (Wang *et al.*, 2006) มีรายงานว่า ปลายด้าน N ของโปรตีน HET-P synthase อยู่บริเวณเมมเบรนของพลาสติดซึ่งพบการแสดงออกของยีน *THI1* มากบริเวณเนื้อเยื่อที่มีสีเขียว Belanger *et al.* (1995) พบว่าในยีสต์ สาร HET-P สามารถสังเคราะห์ได้จาก HET ที่ได้จากการย่อยสลายไทอะมีนและอนุพันธุ์ในไซโทพลาสซึมหรือจากภายนอกเซลล์ (salvage pathway) โดยการทำงานของเอนไซม์ไทแอโซลไคเนสที่ถอดรหัสจากยีน *THI6* (ภาพที่ 2-3) Yazdani *et al.* (2013) รายงานว่าในอะราบิดอฟซิสและข้าวโพดมีโปรตีนคล้ายคลึงกับโปรตีน ThiM ที่ถอดรหัสจากยีน *thiM* ใน *Escherichia coli* ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ สาร HET-P

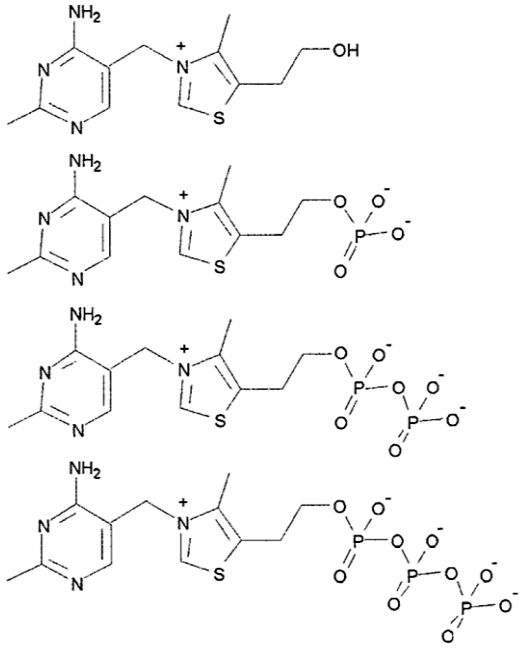
<u>การสังเคราะห์วงแหวนไพริมีดีน</u> การสังเคราะห์วงแหวนไพริมิดีนในพืชคล้ายคลึงกับในแบคทีเรีย โดยเกิดกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับสารตั้งต้น คือ อะมิโนอิมิดาโซลไรโบนิวคลีโอไทด์ (5-aminoimidazole ribonucleotide; AIR) ได้ ไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีนโมโนฟอสเฟต (4-amino-2 methyl-5-hydroxymethylpyrimidine monophosphase; HMP-P) จากการทำงานของเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีนไคเนส (HMP kinase, THIC) ที่ถอดรหัสจากยีน *THIC* ในอะราบิดอฟซิส มีรายงานว่าพบการทำงานของโปรตีน THIC อยู่บริเวณสโตรมาของคลอโรพลาสต์ (Goyer, 2010) จากนั้นเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตจาก ATP ได้เป็นไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีนไพโรฟอสเฟต (HMP-PP) โดยการทำงานของเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีนโมโนฟอสเฟตไคเนส (HMP-P kinase) นอกจากนี้ HMP-P และ HMP-PP เกิดจากการเติมหมู่ฟอตเฟสให้กับ HMP ที่ได้จากภายในและภายนอกเซลล์ (salvage pathway) โดยอาศัยโปรตีน THI20 ในยีสต์ซึ่งประกอบด้วย 3 โดเมน คือ HMP kinase, HMP-P kinase, และเอนไซม์ไทอะมีนเนส (Onozuka *et al.*, 2008) (ภาพที่ 2-2)

<u>การสังเคราะห์ไทอะมีนและอนุพันธุ์</u> เมื่อเกิดการสังเคราะห์แยกกันของวงแหวนไพริมีดีนและวงแหวนไทแอโซลจะเกิดการรวมตัวกันได้เป็นโครงสร้างของไทอะมีนโมโนฟอสเฟต (thiamine monophosphate; TMP) จากการทำงานของเอนไซม์ไทอะมีนฟอสเฟตไพโรฟอสโฟรีเลส (thiamine-phosphate pyrophosphorylase, TPP) การศึกษาในต้นอะราบิดอฟซิส ผักกาดและข้าวโพด พบว่าทั้งสองกระบวนการเกิดจากการทำงานของโปรตีน TH1 BTH1และ THI3 ตามลำดับ (Goyer, 2010) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยสองโดเมนคล้ายกับแบคทีเรียคือด้านปลาย N ทำหน้าที่กระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ HMP (HMP(-P) kinase) และด้านปลาย C ทำหน้าที่กระตุ้นการรวมกันของวงแหวนทั้งสอง ซึ่งอาศัยแมกนีเซียมเป็นโคแฟกเตอร์ (Rapala-Kozik *et al.*, 2007) (Ajjawi *et al.*, 2007) ตรงข้ามกับในยีสต์พบว่าเกิดจากโปรตีน THI6 ถอดรหัสจากยีน *THI6* เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยสองโดเมน คือด้านปลาย N ทำหน้าที่กระตุ้นการรวมวงแหวนและด้านปลาย C กระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ HET ในกระบวนการรีไซเคิล (Kim *et al.*, 1998) ต่อมาไทอะมีนโมโนฟอสเฟตจะถูกดึงหมู่ฟอสเฟตออกโดย

เอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatase) ได้เป็นโครงสร้างของไทอะมีนซึ่งกระบวนการทั้งหมดนี้เกิดในคลอโรพลาสต์ (Rapala-Kozik *et al.*, 2012) จากนั้นไทอะมีนจะเปลี่ยนเป็นไทอะมีนไดฟอสเฟต โดยเอนไซม์ไทอะมีนไพโรฟอสโฟไคเนส (thiamine pyrophosphokinase; TPK) (ภาพที่ 2-2) ที่ได้จากยีน *TPK* ในต้นอะราบิดอฟซิส (Rapala-Kozik *et al.*, 2008) และยีน *THI80* ในยีสต์ (Onozuka *et al.*, 2008) ในไซโตพลาซึม ซึ่งไทอะมีนจะถูกส่งออกมาจากคลอโรพลาสต์ผ่านทางโปรตีน (transporter) ที่จำเพาะ จากการศึกษาของ Rapala-Kozik *et al.* (2012) รายงานว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอะมีน ได้แก่ *THI1, THIC, TH1* และ *TPK* ในต้นกล้าอะราบิดอฟซิสมีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นทำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไทอะมีนและอนุพันธุ์ เมื่อปลูกอยู่ในสภาพที่ก่อให้เกิดสภาวะความเครียดจากปัจจัยทางกายภาพ



ภาพที่ 2-2 กระบวนการสังเคราะห์ไทอะมีนและอนุพันธ์
(ที่มา Rapala-Kozik *et al.*, 2007)



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของไทอะมีนและอนุพันธ์
(ที่มา Pinto *et al.*, 2002)

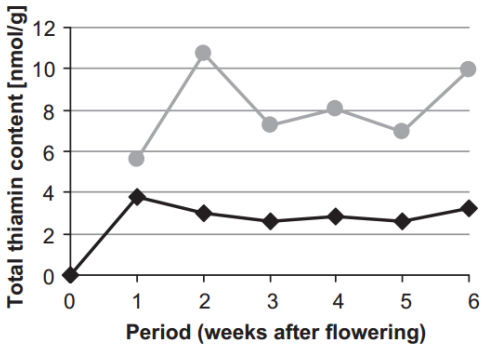
ปริมาณวิตามินบี 1 ในธัญพืชเปรียบเทียบกับข้าว

วิตามินบี 1 เป็นวิตามินที่พบได้มากในเมล็ดธัญพืช โดยพบมาที่เยื่อหุ้มเมล็ด ดังนั้นเมล็ดธัญพืชที่ผ่านกระบวนการขัดสีเพื่อนำเยื่อหุ้มเมล็ดออกจึงมีปริมาณวิตามินบี 1 น้อยกว่าข้าวกล้อง (Lebiedzinska & Szefer, 2006) กรณีของข้าวพบว่าข้าวที่ผ่านการขัดสีมีปริมาณวิตามินบี 1 ลดลงถึง 97 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานพบว่าข้าวกล้อง (long grain) มีปริมาณวิตามินบี 1 0.264 มิลลิกรัม/100 กรัม และมีรายงานปริมาณวิตามินบี 1 ในเมล็ดพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ทานตะวัน ถั่วเหลือง งา ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพดมีปริมาณวิตามินบี 1 เท่ากับ 1.049 0.912 0.716 0.388 0.356 0.058 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ (Lebiedzinska & Szefer, 2006) จากรายงานของ Golda *et al.* (2004) ศึกษาในถั่วลันเตา ข้าวโอ๊ต ถั่วปากอ้าและข้าวโพด พบว่ามีปริมาณไทอะมีนประมาณ 0.329, 0.310, 0.271 และ 0.236 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ และพบว่าในข้าวทริทิเคลี ข้าวสาลีและข้าวไรน์มีไทอะมีน 0.258, 0.215 และ 0.184 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ (Buchholz *et al.*, 2012)จากการศึกษาในข้าวสาลี 49 สายพันธุ์ พบว่ามีปริมาณไทอะมีนเฉลี่ยเป็น 0.38 มิลลิกรัม/ 100 กรัม โดยพันธุ์ที่มีไทอะมีนต่ำสุดคือ

Virtuose มีปริมาณไทอะมีน 0.26 มิลลิกรัม/ 100 กรัมและพันธุ์ที่มีปริมาณของไทอะมีนมากที่สุดคือ Poeme มีปริมาณ 0.61 มิลลิกรัม/ 100 กรัม โดยพันธุ์ที่มีปริมาณไทอะมีนมากและน้อยมีปริมาณไทอะมีนแตกต่างกันถึง 0.35 มิลลิกรัม/ 100 กรัม (Batifoulier *et al.*, 2006) ทั้งนี้รายงานในข้าวไทย 9 พันธุ์ พบว่ามีปริมาณวิตามินบี 1 0.263 มิลลิกรัม/100 กรัม โดยพันธุ์ที่มีปริมาณมากที่สุดได้แก่พันธุ์หอมกัญญา และข้าวหอมนิล มีปริมาณ 0.322 มิลลิกรัม/100 กรัม และพันธุ์ที่มีปริมาณน้อยที่สุด ได้แก่ ข้าวเหนียวดำ (0.171 มิลลิกรัม/100 กรัม) (ผาณิต และคณะ, 2555) เห็นได้ว่าในประชากรพันธุ์ข้าวมีความแปรผันของปริมาณวิตามินบี 1 อยู่เกือบ 50 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณวิตามินบีในเมล็ดพืชชนิดอื่น เช่น ทานตะวัน ที่มีปริมาณมากกว่าข้าวเกือบ 4 เท่าตัว ดังนั้นอาจชี้ให้เห็นถึงโอกาสที่จะสามารถเพิ่มปริมาณวิตามินบี 1 ในเมล็ดข้าวได้ อย่างไรก็ตามการสำรวจปริมาณวิตามินบี 1 ในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ให้มากขึ้นอาจทำให้ได้พบพันธุ์ข้าวที่มีการสร้างและสะสมวิตามินบี 1 สูงก็มีโอกาสเป็นไปได้และสามารถนำไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในภายหลัง

การสังเคราะห์วิตามินบี 1 ในธัญพืชในระยะต่าง ๆ

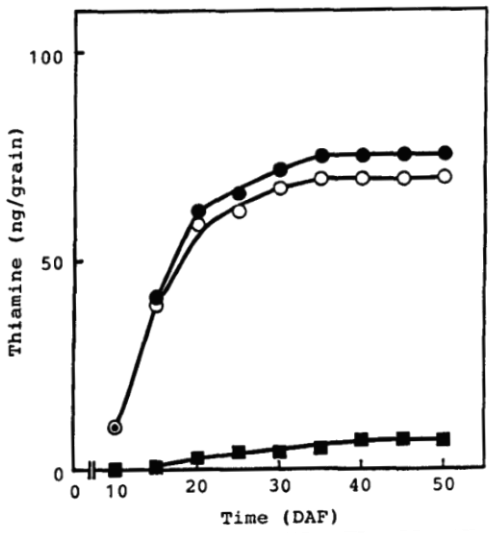
การศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในข้าวสาลี พบว่า เมล็ดข้าวสาลีมีอัตราการสร้างวิตามินบี 1 มากที่สุดในช่วงสัปดาห์แรกของการเจริญของเมล็ดและหลังจากนั้นมีอัตราการสร้างค่อนข้างคงที่ ในข้าวสาลี *Triticum aestivum* พันธุ์ Norin 61 ส่วนพันธุ์ Dekan มีแนวโน้มการสร้างวิตามินบี 1 มากกว่าพันธุ์ Norin 61 แต่อัตราการสร้างค่อนข้างมีความผันแปรมากกว่า (ภาพที่ 2-4)(Buchholz *et al.*, 2012)



ภาพที่ 2-4 ปริมาณไทอะมีนในข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) สองพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Norin 61 (♦) และพันธุ์ Dekan (●)

(ที่มา: Buchholz *et al.* (2012))

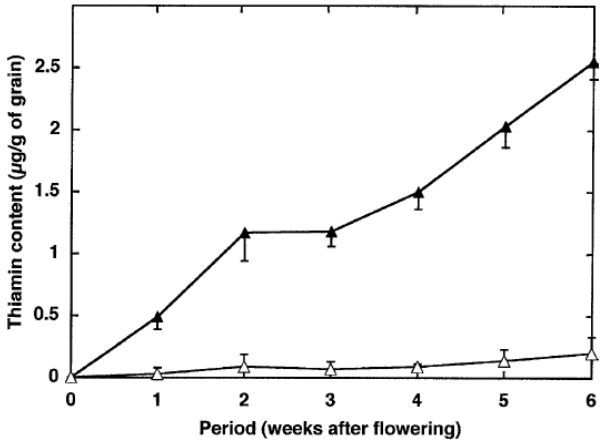
การศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่ระยะการเจริญต่าง ๆ ของเมล็ด พบว่ามี การสร้างและสะสมวิตามินบี 1 มีรูปแบบเช่นเดียวกับในข้าวสาลี โดยมีอัตราการสร้างมากที่สุดในช่วงแรกของการเจริญของเมล็ดจากนั้นปริมาณจะคงที่จนกระทั่งถึงระยะเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 2-5)(Shimizu *et al.*, 1990)



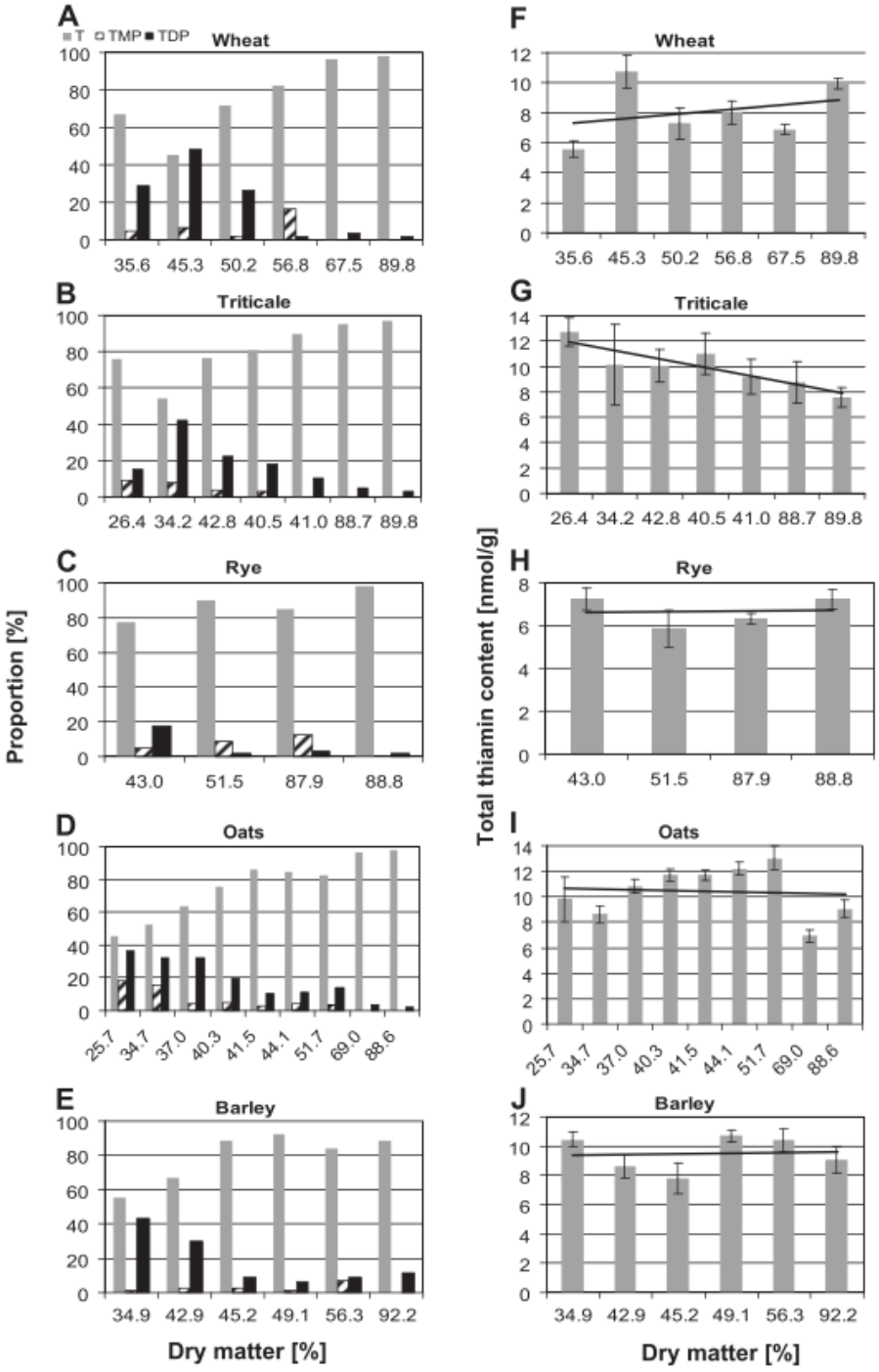
ภาพที่ 2-5 การเปลี่ยนแปลงของไทอะมีนทั้งหมด (total thiamine; ●) ไทอะมีนอิสระ (free thiamine; ○) และไทอะมีนที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ (thiamine ester; ■) ในข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ Nipponbare
(ที่มา: Shimizu *et al.* (1990))

การศึกษาปริมาณของไทอะมีนในเมล็ดงา (*Sesamum indicum* L.) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) ข้าวทริทิเคลี (Triticosecale) ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) ข้าวไรน์ (*Secale cereal*) และข้าวโอ๊ต (*Avena sativa*) พบว่าไทอะมีนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเมล็ดมีพัฒนาการมากขึ้น ขณะที่ปริมาณของไทอะมีนโมโนฟอสเฟตและไทอะมีนไพโรฟอสเฟตคงที่ในเมล็ดงาและลดลงในข้าวสาลี ข้าวทริทิเคลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรน์และข้าวโอ๊ต (ภาพที่ 2-6, 2-7) Buchholz *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาในข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) 2 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ Norin 61 และพันธุ์ Dekan พบว่าพันธุ์ Norin มีการสร้างไทอะมีนมากที่สุดในช่วงสัปดาห์แรกของการเจริญหลังจากดอกบาน ข้าวสาลีพันธุ์ Dekan มีการสร้างไทอะมีนมากกว่าพันธุ์ Norin 61 แต่อัตราการสร้างไม่คงที่ เนื่องจากมีการสร้างไทอามินสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 แล้วลดลงในสัปดาห์ต่อมาและเพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 6 (ภาพที่ 2-8) นอกจากนี้มีการศึกษาในเมล็ดงาพบว่าเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์โปรตีนที่จับกับไทอะมีน (thiamin-binding protein; TBPs) และการจับของไทอะมีนกับโปรตีน (thiamine-binding activity) เพิ่มสูงขึ้น

(ภาพที่ 2-9) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไทอะมีนจะถูกสะสมโดยจับอยู่กับโปรตีนในระยะที่เมล็ดเจริญเต็มที่จนถึงระยะพักตัว เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการเจริญเติบโตระหว่างกระบวนการงอก ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางอิมมูนวิทยา พบว่าในเมล็ดข้าว ข้าวสาลีและข้าวบาร์เลย์มีการสะสมโปรตีนที่จับกับไทอะมีนบริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ด (aleurone layer) (Buchholz *et al.*, 2012; Mundy *et al.*, 1986; Tanaka *et al.*, 1980; Watanabe *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2003)

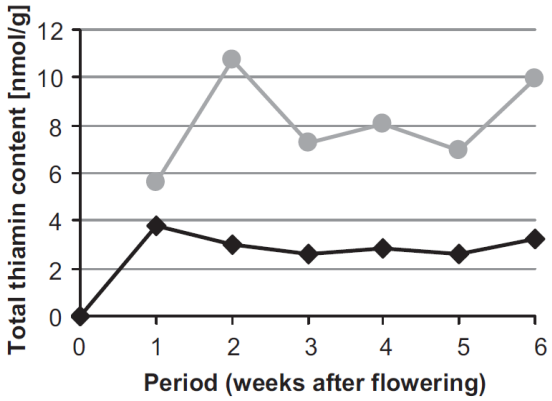


ภาพที่ 2-6 การเปลี่ยนแปลงของไทอะมีน (▲) และไทอะมีนฟอสเฟต (△) ในเมล็ดงาที่กำลังมีการพัฒนาหลังออกดอก
(ที่มา Watanabe *et al.*, 2003)

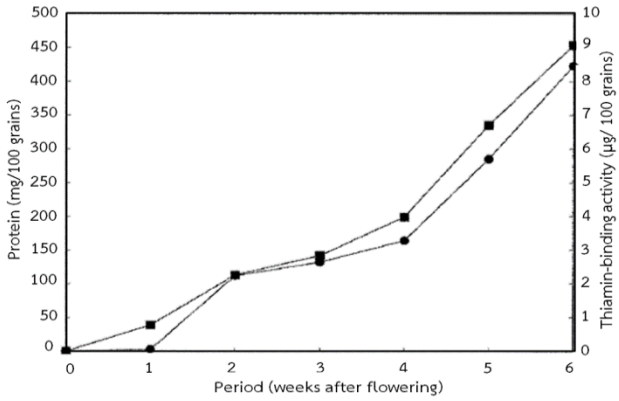


ภาพที่ 2-7 การเปลี่ยนแปลงของไทอะมีนและอนุพันธุ์ระหว่างพัฒนาการของเมล็ด (A) ข้าวสาลี (B) ข้าวทริทิเคลี (C) ข้าวไรน์ (D) ข้าวโอ๊ตและ (E) ข้าวบาร์เลย์ (F-J) แสดงไทอะมีนรวม

(ที่มา Buchholz *et al.*, 2012)



ภาพที่ 2-8 การเปลี่ยนแปลงของไทอะมีนในช่วงการพัฒนาของเมล็ดจากระยะดอกบานในข้าวสาลี (*Triticum aestivum)* สองพันธุ์ คือ พันธุ์ Norin 61 (◆) และพันธุ์ Dekan (●)
(ที่มา Buchholz *et al.*, 2012)



ภาพที่ 2-9 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนที่จับกับไทอะมีน (●) และการจับของไทอะมีนกับโปรตีน (■) ของเมล็ดงาระหว่างการพัฒนาหลังจากดอกบาน
(ที่มา Watanabe *et al.*, 2003)

เอนไซม์ Thiamine-phosphate pyrophosphorylase และกิจกรรม

Kim *et al.* (1998) รายงานว่า โปรตีนที่ได้จากการแสดงออกของยีน BTH1 ใน *Brassica napus* สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 2 ปฏิกิริยา คือ จากการเปลี่ยน HMP-P เป็น HMP-PP โดย HMP-P kinase และการรวมกันของ HMP-PP กับ HET-P โดย TMP pyrophosphorylase ไปเป็น TMP ดังนั้นจึงสรุปว่าโปรตีนนี้เป็น bifunctional enzyme

Rapala-Kozik *et al.* (2007) รายงานการศึกษายีน *thi3* ในข้าวโพด (*Zea mays*) พบว่ายีนดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับในข้าว 77% และ 63% ใน *Medicago truncatula* และเมื่อศึกษาการทำงานของโปรตีนที่เป็นผลผลิตจากยีนนี้พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้นจาก HMP-P ไปเป็น HMP-PP และ จาก HMP-PP กับ HET-P ไปเป็น TMP โดยมี $Mg2^{+}$ เป็นโคแฟกเตอร์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโปรตีนที่เป็นผลผลิตจาก *thi3* เป็นโปรตีนที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 2 ปฏิกิริยา หรือเรียกว่า bifunctional enzyme โดยเมื่อศึกษากิจกรรมของโปรตีนนี้ คือ TMP synthase พบว่ามีกิจกรรมเป็น 2.46 nmol TMP/min/mg protein แต่เมื่อศึกษากิจกรรมของ HMP-P kinase/ TMP pyrophosphorylase (HMPK/TPP) พบว่ามีกิจกรรมเพียง 0.22 nmol TMP/min/mg protein และ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกข้าว

- จานเพาะเชื้อ
- กระดาษเพาะเมล็ด
- กระถางซีเมนต์ ขนาด 80 × 80 × 30 เซนติเมตร
- กระถางปลูก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 26 เซนติเมตร
- ดินปลูก (ดินตราน้องพร)
- ปุ๋ยออสโมโคส (Osmocote, Sotus) สูตร 13-13-13

อุปกรณ์และสารเคมี

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง
- ปิเปตแก้วขนาด 5 มิลลิลิตร
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer; Biochrom Libra S11)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) eppendorf รุ่น 5418 R
- เครื่องดูดปล่อยสารอัตโนมัติ (autopipet)
- เครื่องโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง ((High Performance Liquid Chromatography; Agilent 1260)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)
- เครื่องกวนสารละลายและให้ความร้อน (Magnetic stirrer)
- ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
- ที่กรองสารสำหรับกระบอกฉีดยา (acrodisc syringe filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
- ตัวกรองเมมเบรน (filter membrane) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
- กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร
- กระบอกฉีดยาขนาด 50 มิลลิลิตร
- อลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum foil)
- Dowex 50Wx8 hydrogen form

- กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid)
- ฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ (Diphosphorus pentoxide)
- ไทแอโซลเอทานอล (4-methyl-5-thiazoleethanol)
- อะซีโตน (acetone)
- แมกนีเซียมออกไซด์ (magnesiumoxide, MgO)
- แอมโมเนีย (ammonia)
- แอมโมเนียบัฟเฟอร์ (NH_4Cl-NH_3•H_2O buffer, pH 7.7)
- โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol, PVA)
- บรอมไทมอลบลู (bromothymol blue)
- ไทอะมีนไฮโดรคลอไรด์ (thiamine hydrochloride)
- อะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile, HPLC-grade)
- ฟอสเฟตบัพเฟอร์, (phosphate buffer, pH 5.6
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ (Tris-HCl, pH 7.5)
- สารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford's reagent)
- โบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA)
- ไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีน (hydroxymethylpyrimidine; HMP)
- ไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต (hydroxyethylthiazole monophosphate, HET-P)
- อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP)
- แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride, $MgCl_2$)
- กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl)
- เอนไซม์ทาคาไดแอสเทส (takadiastase)

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองตอนที่ 1 การศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในข้าวไทย

<u>พันธุ์ข้าวและวิธีการปลูก</u>

นำข้าวไทย จำนวน 30 พันธุ์ ได้แก่ กข1 กข3 กข7 กข9 กข11 กข15 กข23 กข29 กข31 กข41 กข43 กข49 สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 2 สุพรรณบุรี 3 สุพรรณบุรี 60 สุพรรณบุรี 90 ชัยนาท 1 ชัยนาท 2 ปทุมธานี 1 ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวเจ้าหอมสุพรรณ ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 1 เหลืองปะทิว พิษณุโลก 2 (ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) ล้นยุ้ง เหลืองอ่อน ขาวตาหวิน พัทลุง และหอมแดง (เก็บจากพื้นที่จังหวัดจันทบุรี) มาเพาะลงในจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นจึงนำต้นกล้ามาปลูกลงในกระถางพลาสติก ที่มีดินผสมกับปุ๋ยออสโมโคต สูตร 13-13-13จำนวน

10 กรัม นำกระถางพลาสติกแช่ลงในกระถางซีเมนต์ เติมน้ำลงในกระถางซีเมนต์ให้น้ำอยู่ที่ระดับผิวดิน จากนั้นดูแลรักษาจนกระทั่งข้าวออกรวง และไขน้ำออกจากกระถางซีเมนต์เมื่อรวงเริ่มสุก ทำการเก็บเกี่ยวข้าวเมื่อรวงสุกเต็มที่

ผลผลิตข้าว

ศึกษาผลผลิตข้าวที่ได้โดย ทำการชั่งหาน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือกและข้าวกล้อง เพื่อหาน้ำหนักต่อ 1,000 เมล็ด โดยคำนวณหาที่ระดับความชื้นของเมล็ดเท่ากับ 14 เปอร์เซ็นต์

การหาปริมาณวิตามินบี 1 โดยวิธีการทางสเปกโตโฟโตเมตรี (spectrophotometry method)

หาปริมาณวิตามินบี 1 โดยวิธีการทางสเปกโตโฟโตเมตรี โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Liu *et al.* (2002) ดังนี้ นำเมล็ดข้าวประมาณ 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดและเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร เพื่อสกัดวิตามินบี 1 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที (rpm) นำสารละลายส่วนใสไปใช้เพื่อหาปริมาณวิตามินบี 1 โดยเติม NH_4Cl-NH_3•H_2O pH 7.7 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติม 1% polyvinyl alcohol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.5% โบรโมไธมอลบลู ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 1 โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ ไทอะมีน-ไฮโดรคลอไรด์ (thiamine hydrochloride, Sigma)

การทดลองตอนที่ 2 การศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในแต่ละระยะการเจริญของเมล็ด

เมื่อทำการหาปริมาณวิตามินบี 1 ในข้าวครบ 30 พันธุ์ จากนั้นทำการคัดเลือกข้าวที่มีปริมาณวิตามินบี 1 มากที่สุด ปานกลาง และน้อยที่สุด อย่างละ 2 พันธุ์ เพื่อใช้ในการทดลองที่ 2 โดยปลูกข้าวและดูแลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าว 4 ระยะการเจริญ คือ ระยะเริ่มออกดอก ระยะข้าวน้ำนม ระยะข้าวเม่า และระยะเก็บเกี่ยว โดยเก็บข้าวไว้ในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 1 โดยนำเมล็ดข้าวทั้ง 4 ระยะที่ประกอบด้วยกาบล่าง (lemma) กาบบน (palea) และเมล็ด (grain) จำนวนซ้ำละ 20 เมล็ด ทำการทดลอง 4 ซ้ำ (biological replication) มาบดด้วยไนโตรเจนเหลว เมื่อตัวอย่างละเอียดแล้วทำการสกัดด้วยน้ำ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และบดต่อให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกันด้วยโกร่งบด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นเก็บสารละลายส่วนใส นำไปกรองผ่านเยื่อกรอง (membrane filtered) ขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณไทอะมีนด้วย HPLC โดยดัดแปลงจากวิธีของ Moongngarm and Saetung (2010) ดังนี้ ใช้คอลัมน์ C-18 (Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18, 4.6x150 mm, 4 um Agilent) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลซียส ทำการฉีด

สารละลายตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วชะด้วย 50 mM phosphate buffer pH 5.6 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 v/v ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจหาปริมาณไทอะมีนโดย UV detector ที่ความยาวคลื่น 233 nm นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทอะมีน-ไฮโดรคลอไรด์ (thiamine hydrochloride, Sigma)

การทดลองตอนที่ 3 การศึกษากิจกรรมของเอ็นไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/ Thiamine-phosphate pyrophosphorylase (HMPK/TPP) ในระหว่างการเจริญของเมล็ด

การสังเคราะห์สารตั้งต้นไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต (HET-P)

สังเคราะห์ HET-P จากสารตั้งต้น 4-methyl-5-thiazoleethanol ตามวิธีของ Leichssenring and Schmidt (1962) โดยเติมกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 16 มิลลิลิตร จากนั้นเติมฟอสฟอรัสเพน ทอกไซด์ 24.5 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 4-methyl-5-thiazoleethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งชุดรีฟลักซ์พร้อมให้ความร้อนประมาณ 135-140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปล่อยให้สารละลายเย็นลงและมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายสารที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 32 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วจึงเทสารละลายที่ได้ใส่ในอะซิโตน ปริมาตร 120 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 120 มิลลิลิตรและแมกนีเซียมออกไซด์ 3.4 กรัม คนสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง magnetic stirrer ปรับให้สารละลายมี pH เป็น 7.5 ด้วยสารละลายแอมโมเนีย นำไปกรองผ่านคอลัมน์ขนาด 3x10 เซนติเมตร ที่บรรจุ Dowex 50Wx8 hydrogen form โดยใช้น้ำเป็นตัวชะ ทำการเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ครั้งละ 10 มิลลิลิตร (fraction) จากนั้นนำสารละลายที่แต่ละ fraction มาตรวจสอบเบื้องต้นภายใต้แสง UV นำสารละลายส่วนที่มีการเรืองแสง UV มากำจัดน้ำออกด้วยวิธีฟรีซดราย จากนั้นนำสารที่ได้ 10 มิลลิกรัมเพื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance

การสกัดเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine-phosphate pyrophosphorylase และการหาปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างเมล็ดข้าว (ประกอบด้วย กาบล่าง (lemma) และกาบบน (palea)) ทั้ง 4 ระยะจำนวน 48 เมล็ด โดยทำการบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียดจากนั้นเติม 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) ที่แช่เย็นในน้ำแข็ง และบดด้วยโกร่งที่วางอยู่ในถาดน้ำแข็งตลอดเวลาจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ส่วนหนึ่งไปหาปริมาณโปรตีนและอีกส่วนหนึ่งนำไปใช้สำหรับการหากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford’s assay โดยใช้สารสะลายส่วนใส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายแบรดฟอร์ดปริมาตร 1,450 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในตู้มืดเป็นเวลา 5 นาทีที่

อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน (BSA)

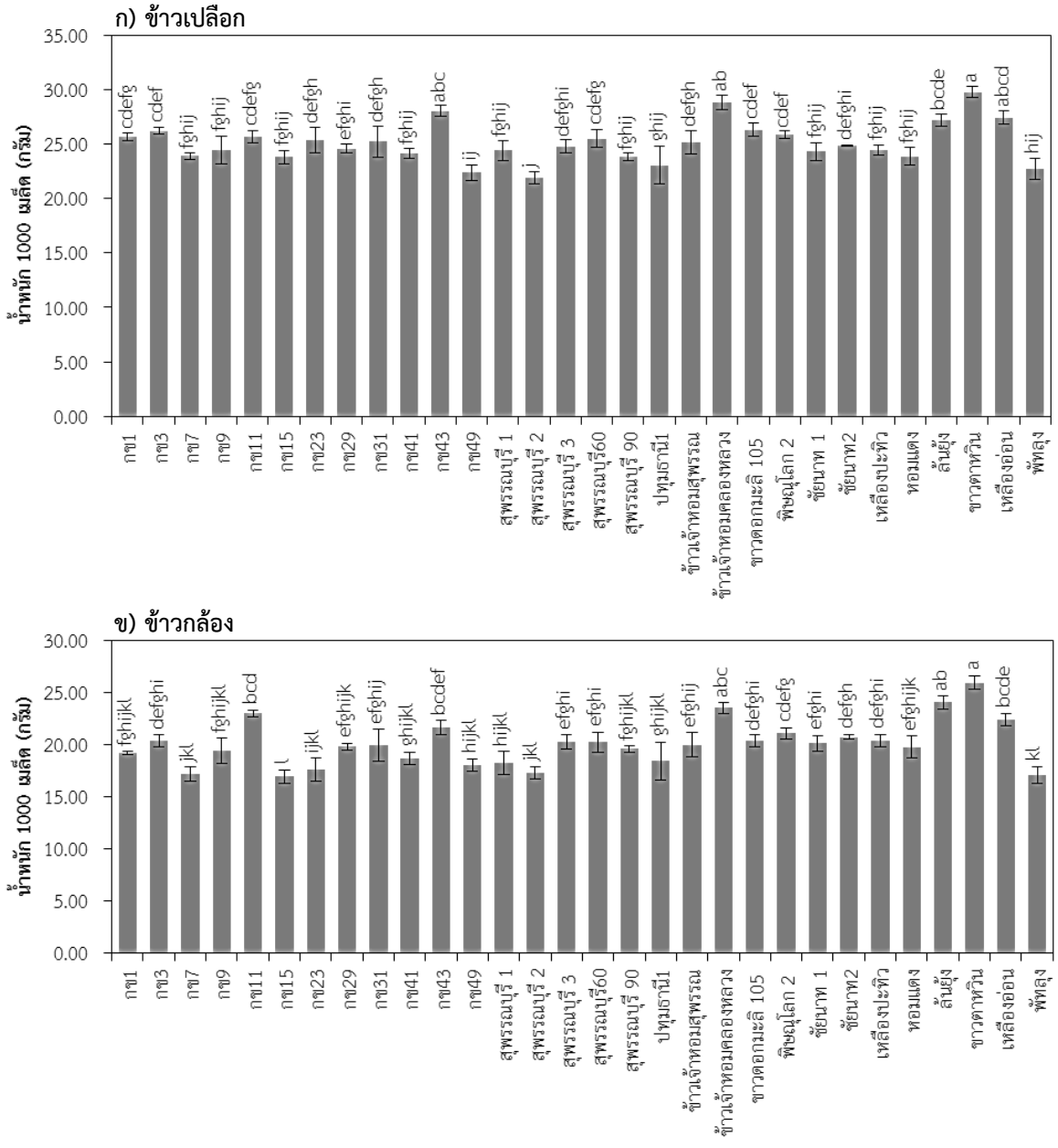
<u>การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์</u> Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine-phosphate pyrophosphorylase

การหากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP โดยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Y. Kawasaki *et al.* (1990) และ Rapala-Kozik *et al.* (2008) ดังนี้ 50 µM HMP, 50 µM HET-P, 10 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$ และสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดโปรตีนปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร ปริมาตรโดยรวมเท่ากับ 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 3 M HCl ต้มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกโปรตีนที่เสียสภาพออก ปรับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายส่วนใสให้เป็น 4.5 ด้วยโซเดียมอะซีเตรท ความเข้มข้น 4 โมลาร์ จากนั้นอนุพันธ์ของไทอะมีน (thiamine phosphates) จะถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolysed) ไปเป็นไทอะมีนด้วยการเติม takadiastase 1% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณไทอะมีนด้วยเทคนิค HPLC เช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 2

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การทดลองตอนที่ 1 การศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในข้าวไทย

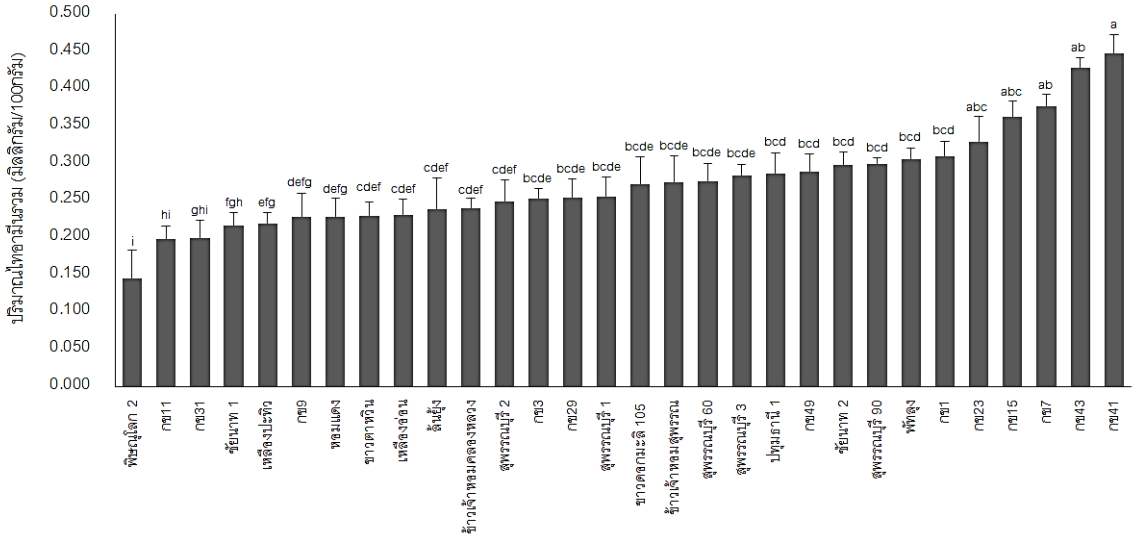
จากการปลูกข้าวจำนวน 30 พันธุ์ และเก็บตัวอย่างรวงที่เจริญเต็มที่ นำข้าวเปลือกและข้าวกล้องมาชั่งหาน้ำหนัก 1,000 เมล็ด พบว่า ข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือก 1,000 เมล็ด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางผนวกที่ 1 และ 2) โดยมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 21.85-29.78 กรัม โดยข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี2 มีน้ำหนักน้อยที่สุด ส่วนพันธุ์ขาวตาหวินมีน้ำหนักมากที่สุด (ภาพที่ 4-1ก) เมื่อนำข้าวเปลือกที่ได้ไปนำแกลบออกพบว่า ข้าวทั้ง 30 พันธุ์ มีน้ำหนักเมล็ดข้าวกล้อง 1,000 เมล็ด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางผนวกที่ 3 และ 4) โดยมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 16.90-25.89 กรัม โดยข้าวพันธุ์ กข15 มีน้ำหนักข้าวกล้อง 1,000 เมล็ดน้อยที่สุด ส่วนพันธุ์ขาวตาหวินมีน้ำหนักมากที่สุด (ภาพที่ 4-1ข)



ภาพที่ 4-1 ก) น้ำหนักข้าวเปลือก 100 เมล็ด และ ข) น้ำหนักข้าวกล้อง 1000 เมล็ด (แถบความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดง standard error; ตัวอักษรโรมันเหนือแท่งกราฟแสดงความแตกต่างของข้อมูลเมื่อทดสอบโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test ($p \leq 0.05$))

จากการนำเมล็ดข้าวกล้อง มาสกัดและศึกษาปริมาณไทอะมีนรวมพบว่า ข้าวกล้องทั้ง 30 พันธุ์ มีปริมาณไทอะมีนรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางผนวกที่ 5) ซึ่งเมล็ดข้าวกล้อง 5 พันธุ์ที่มีปริมาณของไทอะมีนรวมมากที่สุด ได้แก่ กข41 กข43 กข7 กข15 และกข23 ข้าวพันธุ์ที่มีปริมารไทอะมีนรวมรองลงมาได้แก่ พันธุ์กข1 พัทลุง สุพรรณบุรี 90 ชัยนาท 2 กข49 ปทุมธานี 1 สุพรรณบุรี 3 สุพรรณบุรี 60 ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี ขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี 1 กข29 กข3 สุพรรณบุรี 2 ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 1 ล้นยุ้ง เหลืองอ่อน ขาวตาหวิน หอมแดง กข9 เหลืองประทิว และชัยนาท 1 ตามลำดับ ส่วนข้าวกล้องที่มีปริมาณไทอะมีนรวมน้อยที่สุด คือ กข31 กข11 และพิษณุโลก 2 (ภาพที่ 4-2) โดยข้าวกล้องทั้ง 30 พันธุ์มีปริมาณไทอะมีนรวมอยู่ระหว่าง 0.144-0.447 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยมีไทอะมีนรวมเฉลี่ยเท่ากับ 0.274 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

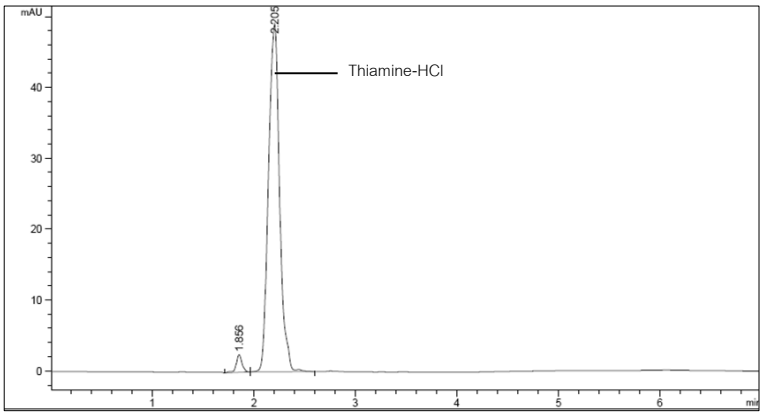
จากการศึกษาสามารถแบ่งพันธุ์ข้าวจากปริมาณไทอะมีนรวมได้ทั้งหมด 9 กลุ่ม (ตารางภาคผนวกที่ 6) จากนั้นทำการเลือกพันธุ์ที่มีปริมาณไทอะมีนรวมในกลุ่มสูง ปานกลางและต่ำกลุ่มละ 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ กข41 กข43 สุพรรณบุรี 1 กข29 กข11 และพิษณุโลก 2 เพื่อนำไปศึกษาปริมาณไทอะมีนในแต่ละระยะการเจริญของเมล็ดและกิจกรรมของเอ็นไซม์ HMPK/TPP ในการทดลองตอนที่ 2 และ 3 ต่อไป



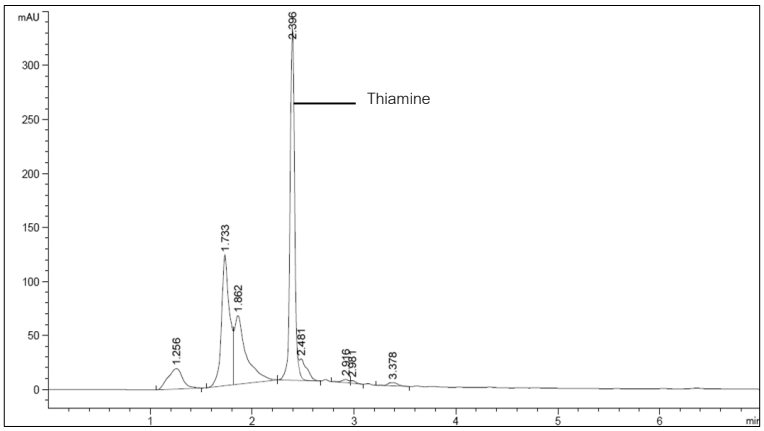
ภาพที่ 4-2 ปริมาณไทอะมีนในเมล็ดข้าวกล้อง 30 พันธุ์ (แถบความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดง standard error; ตัวอักษรโรมันเหนือแท่งกราฟแสดงความแตกต่างของข้อมูลเมื่อทดสอบโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test ($p \leq 0.05$))

การทดลองตอนที่ 2 การศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในแต่ละระยะการเจริญของเมล็ด

การทดลองหาปริมาณไทอะมีนในข้าวระยะต่าง ๆ โดยใช้ การสกัด แยกและหาปริมาณโดย HPLC โดยการใช้ ไทอะมีน-ไฮโดรคลอไรด์เป็นสารมาตรฐาน พบว่า เมื่อนำไปแยกโดย HPLC ที่ใช้คอลัมน์ C-18 (Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18, 4.6x150 mm, 4 um Agilent) ใช้ 50 mM phosphate buffer pH 5.6 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 v/v เป็น mobile phase โดยควบคุมอัตราการไหลที่ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาทีและใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 233 nm เป็นตัวตรวจวัด ทั้งนี้พบว่าไทอะมีน-ไฮโดรคลอไรด์ ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมี retention time เท่ากับ 2.20 นาที (ภาพที่ 4-3) และเมื่อฉีดไทอะมีนมาตรฐานนี้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำข้อมูลที่ได้ไปหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับความสูงของโครมาโตแกรม พบว่ามีความสัมพันธ์เป็น $Y = 2.453X - 48.029$ ($R^2 = 0.999$) จากนั้นนำสารสกัดเมล็ดข้าวด้วยน้ำไปฉีดภายใต้ HPLC ที่สภาวะเดียวกัน และนำความสูงของโครมาโตแกรมไปคำนวณหาปริมาณไทอะมีนตามสมการต่อไป (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-3 โครมาโตแกรมของไทอะมีน-ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่แยกภายใต้ HPLC ที่ใช้คอลัมน์ C-18 (Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18, 4.6x150 mm, 4 um Agilent) ใช้ 50 mM phosphate buffer pH 5.6 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 v/v เป็น mobile phase โดยควบคุมอัตราการไหลที่ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาทีและใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 233 nm



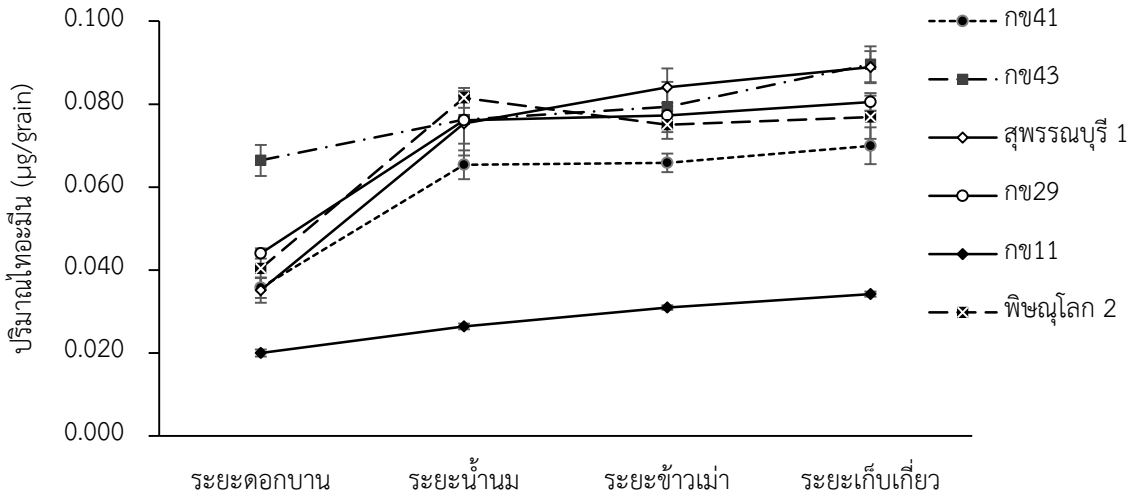
ภาพที่ 4-4 โครมาโตแกรมของสารสกัดเมล็ดข้าวด้วยน้ำกลั่น ที่แยกภายใต้ HPLC ที่ใช้คอลัมน์ C-18 (Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18, 4.6x150 mm, 4 um Agilent) ใช้ 50 mM phosphate buffer pH 5.6 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 v/v เป็น mobile phase โดยควบคุมอัตราการไหลที่ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาทีและใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 233 nm

การศึกษาปริมาณไทอะมีนในเมล็ดข้าวที่กำลังเจริญเติบโต 4 ระยะ ได้แก่ ระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยว พบว่าระยะเก็บเกี่ยวเป็นระยะที่พบปริมาณของไทอะมีนมากที่สุดในข้าว 5 พันธุ์คือ กข41 กข43 สุพรรณบุรี 1 กข29 และกข11 ขณะที่พันธุ์พิษณุโลก 2 มีปริมาณไทอะมีนสูงที่สุดในระยะน้ำนม จากนั้นลดลงในระยะข้าวเม่าและคงที่จนกระทั่งถึงระยะเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 4-5)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่าข้าวพันธุ์กข41 สุพรรณบุรี 1 และพิษณุโลก 2 มีการสะสมของไทอะมีนในระยะดอกบานแตกต่างจากระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยวที่นัยสำคัญ 0.05 (ตารางผนวกที่ 7) ขณะที่พันธุ์กข43 กข29 และกข11 ทั้ง 4 ระยะมีการสะสมไทอะมีนไม่แตกต่างกัน (ตารางผนวกที่ 8) ในระยะดอกบานมีไทอะมีนอยู่ในช่วง 0.020-0.066 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ระยะน้ำนมมีไทอะมีนอยู่ในช่วง 0.026-0.082 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยวมีไทอะมีนอยู่ในช่วง 0.031-0.084 และ 0.034-0.090 ไมโครกรัมต่อเมล็ดตามลำดับ

เมื่อพิจารณารูปแบบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของไทอะมีนในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของเมล็ด พบว่า มีรูป 2 แบบ คือ รูปแบบที่ 1 ปริมาณไทอะมีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะการเจริญเติบโต โดยพบในพันธุ์ กข11 กข43 และสุพรรณบุรี 1 และรูปแบบที่ 2 มีแนวโน้มของปริมาณไทอะมีนเพิ่มขึ้นจากระยะดอกบาน และเพิ่มขึ้นมากที่ระยะน้ำนมจากนั้นปริมาณคงที่จนกระทั่งเก็บเกี่ยว ได้แก่รูปแบบที่พบในพันธุ์ กข29 กข41 และพิษณุโลก 2

เมื่อพิจารณาการเพิ่มขึ้นของปริมาณไทอะมีนพบว่า ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีการสะสมของไทอะมีนเพิ่มขึ้นมากที่สุดโดยเพิ่มขึ้นถึง 0.054 ไมโครกรัมต่อเมล็ดจากระยะดอกบานจนกระทั่งระยะเก็บเกี่ยว รองลงมาได้แก่ พันธุ์กข29 พิษณุโลก 2 กข41 กข43 และกข11 มีการสะสมไทอะมีนเพิ่มขึ้น 0.037, 0.037, 0.041, 0.023 และ 0.014 ไมโครกรัมต่อเมล็ดตามลำดับ ขณะที่ไทอะมีนโมโนฟอสเฟตและไทอะมีนไพโรฟอสเฟตมีปริมาณน้อยมากและไม่สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่าง

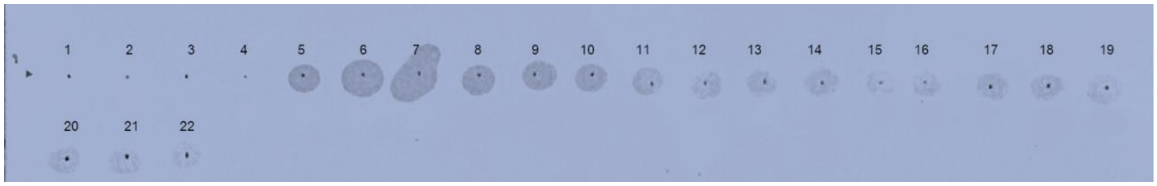


ภาพที่ 4-5 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไทอะมีนระหว่างการพัฒนาของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์ (แถบความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error)

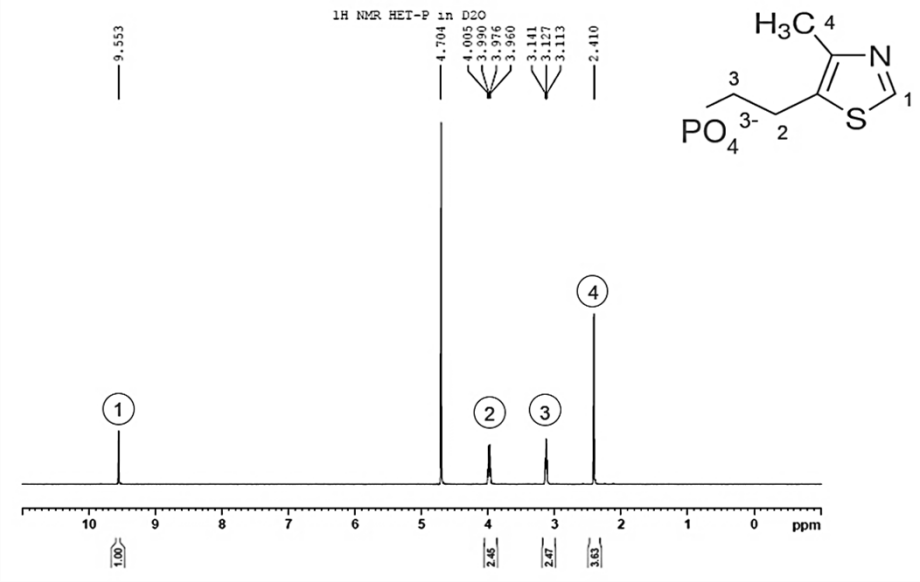
การทดลองตอนที่ 3 การศึกษากิจกรรมของโปรตีน Hydroxymethylpyrimidine kinase/ Thiamine-phosphate pyrophosphorylase (HMPK/TPP) ในระหว่างการเจริญของเมล็ด

<u>การสังเคราะห์สารตั้งต้นไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต (HET-P)</u>

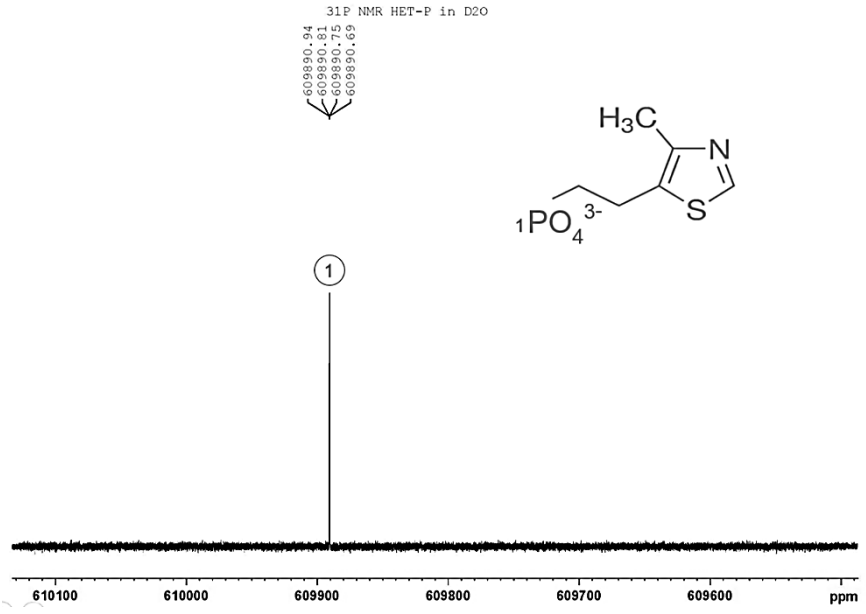
เนื่องจากสาร HET-P เป็นสารตั้งต้นที่จำเป็นสำหรับการศึกษากิจกรรมของเอ็นไซม์ TPP แต่บริษัทผลิตสารเคมียกเลิกการผลิตและการขาย ดังนั้นจึงจำเป็นทำการสังเคราะห์สารดังกล่าว โดยทำการสังเคราะห์ตามวิธีการของ Leichssenring and Schmidt (1962) โดยสังเคราะห์ HET-P จากสารตั้งต้น 4-methyl-5-thiazoleethanol ด้วยปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชั่นกับกรดฟอสฟอริก จากนั้นนำสารที่ได้ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Dowex 50Wx8 hydrogen form แล้วชะด้วยน้ำ เก็บสารละลายที่ได้เป็น fraction fraction ละ 10 มิลลิลิตรและนำมาตรวจสอบเบื้องต้นภายใต้รังสี UV พบว่าใน fraction ที่ 1-4 ไม่พบการเรืองแสง ขณะที่ fraction 5-22 มีการเรืองแสง UV อย่างชัดเจนและคล้ายคลึงกันทั้ง 3 ซ้ำของการแยกสารละลายผ่านคอลัมน์ (ภาพที่ 4-6) อย่างไรก็ตามสูตรโครงสร้างของ 4-methyl-5-thiazoleethanol เป็นสารประกอบแอโรแมติกเฮเทอโรไซคลิกเช่นเดียวกับ HET-P ทำให้ไม่สามารถทราบได้แน่ชัดว่าการเรืองแสงที่พบเกิดจากการเรืองแสงของสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงนำสารละลายใน fraction ที่ 5-10 ซึ่งมีการเรืองแสงอย่างชัดเจนไปวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่อง NMR ซึ่งทำการวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอน (^{1}H NMR) (ภาพที่ 4-7) และทำการการวิเคราะห์สเปกตรัมของฟอสเฟต (^{31}P NMR) (ภาพที่ 4-8) ซึ่งจากสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR พบสเปกตรัมโปรตอน 4 จุดที่ตรงกับโครงสร้างของ HET-P และเมื่อวิเคราะห์ ^{31}P-NMR พบสเปกตรัมของฟอสเฟต 1 จุด ตรงกับโครงสร้างของ HET-P ดังนั้นผลการวิเคราะห์จึงสามารถยืนยันได้ว่า เกิดปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชั่นระหว่าง 4-methyl-5-thiazoleethanol และกรดฟอสฟอริก ได้เป็นผลิตภัณฑ์ HET-P เพื่อใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine-phosphate pyrophosphorylase ต่อไป



ภาพที่ 4-6 จุดของสารที่ได้จากการสังเคราะห์และนำไปแยกโดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Dowex 50Wx8 hydrogen form บนแผ่น TLC ภายใต้แสง UV (ตัวเลขเหนือจุดสารหมายถึง ลำดับ fraction ที่เก็บสารละลายจากคอลัมน์)



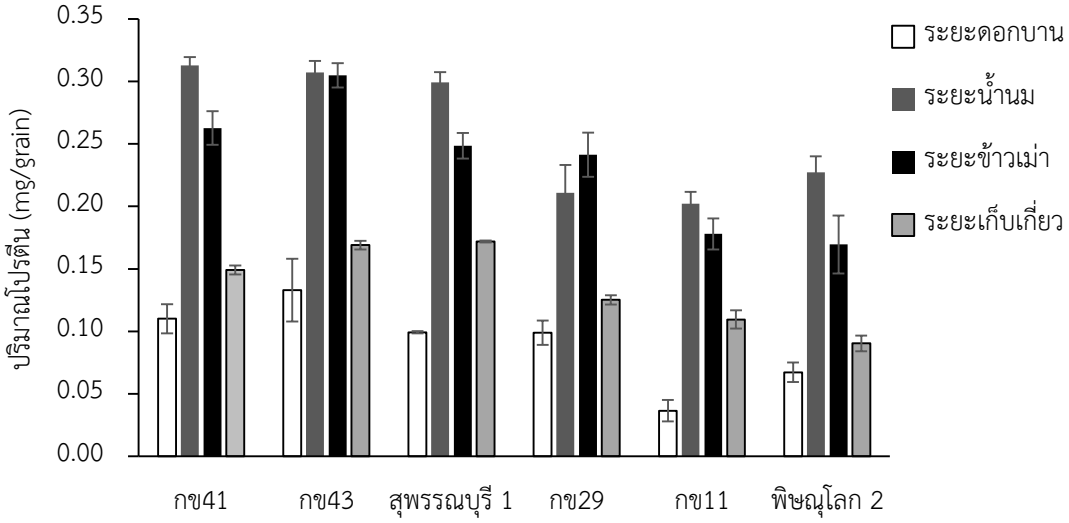
ภาพที่ 4-7 ผลการวิเคราะห์จาก ^{1}H-NMR ของสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้



ภาพที่ 4-8 ผลการวิเคราะห์จาก ^{31}P-NMR ของสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้

การศึกษาปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวที่ระยะการพัฒนาของเมล็ด

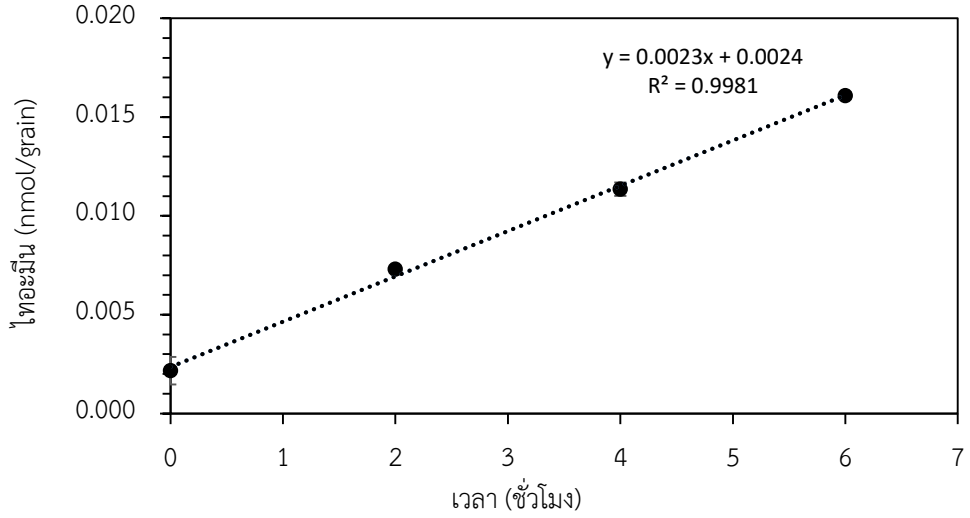
เมื่อนำเมล็ดข้าวมาทำการสกัดโปรตีน และนำไปศึกษาปริมาณโปรตีน พบว่า ปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวระยะต่าง ๆ ของข้าวมีลักษณะคล้ายคลึงกันกล่าวคือ มีปริมาณในระยะดอกบานน้อยที่สุด จากนั้นเพิ่มขึ้นมากที่สุดในระยะน้ำนมแล้วค่อย ๆ ลดลงในระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยว ยกเว้นในพันธุ์กข43 ที่ปริมาณโปรตีนในระยะน้ำนมและข้าวเม่าเท่ากัน และ พันธุ์กข29 ที่ปริมาณโปรตีนในระยะข้าวเม่ามากกว่าในระยะน้ำนม และจากการนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า พันธุ์ข้าวและระยะการเจริญของเมล็ดมีปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ในเมล็ดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางผนวกที่ 9) โดยผลวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยวิธี DMRT (ตารางผนวกที่ 10) ทำให้สามารถจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวตามปริมาณโปรตีนได้ดังนี้ ข้าวพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม a ซึ่งมีโปรตีนมากที่สุดได้แก่ กข43 ข้าวพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม b ซึ่งมีโปรตีนมาก ได้แก่ กข41 และสุพรรณบุรี 1 ข้าวพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม c ซึ่งมีโปรตีนน้อยได้แก่ กข29 และข้าวพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม d ซึ่งมีโปรตีนน้อยที่สุดได้แก่ กข11 และพิษณุโลก 2 และเมื่อพิจารณาความแตกต่างของระยะการเจริญของเมล็ดโดยวิธี DMRT พบว่า ระยะน้ำนมมีปริมาณโปรตีนมากที่สุด รองไปได้แก่ ระยะข้าวเม่า ระยะเก็บเกี่ยวและระยะดอกบาน ตามลำดับ (ภาพที่ 4-9)



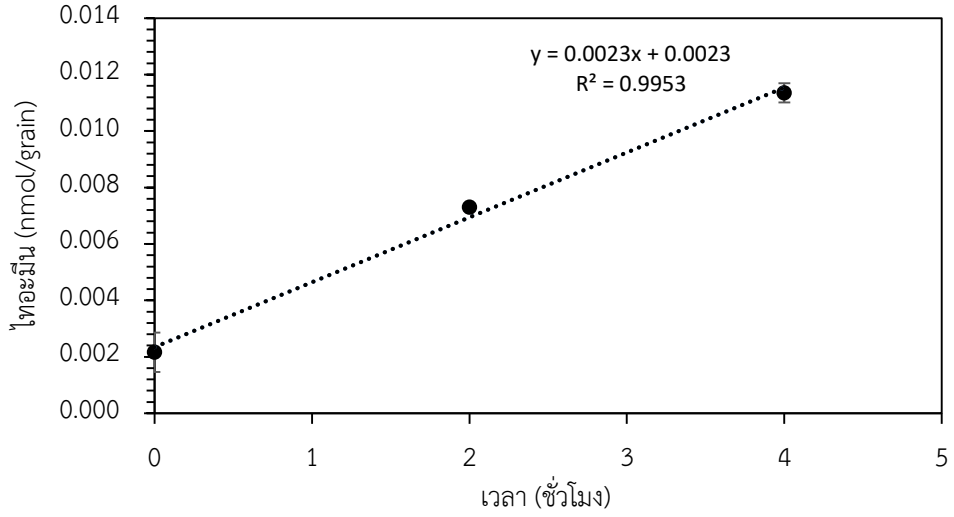
ภาพที่ 4-9 ปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่เจริญในระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่า และระยะเก็บเกี่ยว (แถบความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดง standard error)

การศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP

เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยาเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Y. Kawasaki *et al.* (1990) และ Rapala-Kozik *et al.* (2008) โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 50 µM HMP, 50 µM HET-P, 10 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$ และสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดโปรตีนปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร เนื่องจากไทอะมีนเป็นโคเอนไซม์ที่ใช้ในการทำงานร่วมกับเอนไซม์จึงมีอัตราการทำงานค่อนข้างต่ำ รวมทั้งมีการสร้างไทอะมีนได้น้อย การใช้เวลาน้อยเกินไปอาจได้ไทอะมีนไม่มากพอที่ HPLC จะตรวจวัดได้ รวมทั้งการใช้เวลาในการบ่มมากไปอาจทำให้สารตั้งต้นที่ให้ไม่เพียงพอและนำไปสู่การได้กิจกรรมของเอนไซม์ที่น้อยกว่าความเป็นจริง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับศึกษากิจกรรม โดยทำการศึกษาที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมงจาการศึกษาพบว่าการบ่มที่ระยะเวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์กับเวลา พบว่า มีความสัมพันธ์ในเชิงบวก และพบว่ามีความสัมพันธ์เป็น $y = 0.0023x + 0.0024$ โดยมีค่า $R^2= 0.9981$ และไม่พบว่าในการบ่มปฏิกิริยาเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP มีอัตราลดลง แม้ว่าจะบ่มเป็นเวลาถึง 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-10) และพบว่าการใช้ระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาเพียง 4 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-11) มีความสัมพันธ์เป็น $y = 0.0023x + 0.0023$ โดยมีค่า $R^2= 0.9953$ ทำให้เห็นได้ว่าในการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง ได้ความชันของกราฟเท่ากัน ดังนั้นเมื่อนำไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์จะได้ค่าที่เท่ากัน และเมื่อพิจารณาถึงขนาดของความสัมพันธ์โดยพิจารณาจากค่า R^2 พบว่ามีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย และอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ รวมทั้งการบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 4 ชั่วโมงมีปริมาณไทอะมีนที่เกิดขึ้นเพียงพอต่อการตรวจวัดด้วยHPLC ดังนั้นจึงใช้การบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4-10 ความสัมพันธ์ของปริมาณไทอะมีนที่ถูกสร้างขึ้นหลังจากบ่มเป็นเวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 50 µM HMP, 50 µM HET-P, 10 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$ และสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดโปรตีนปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร

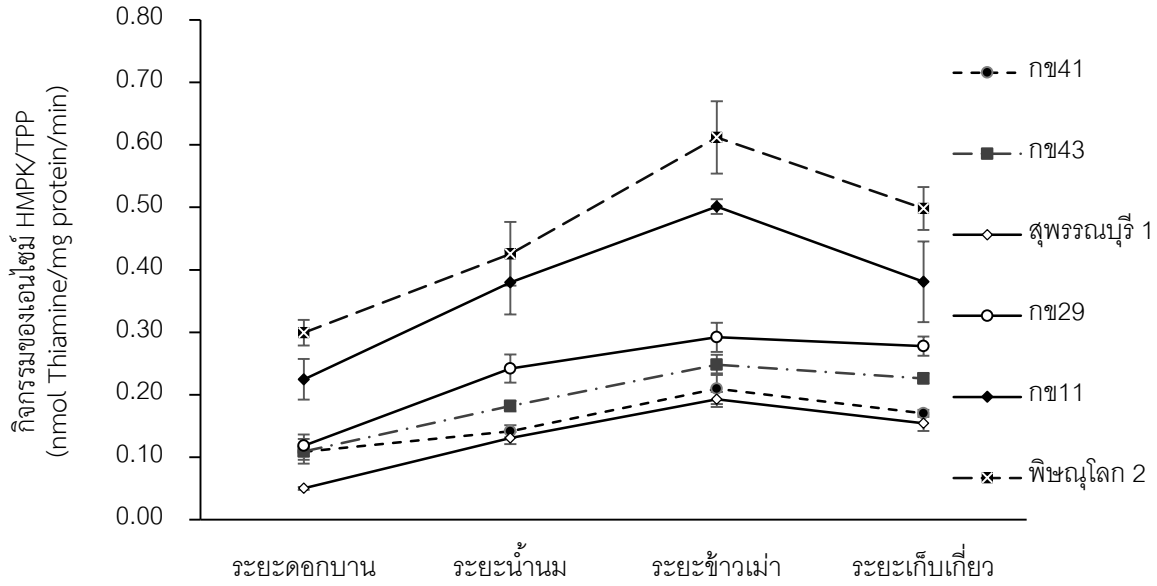


ภาพที่ 4-11 ความสัมพันธ์ของปริมาณไทอะมีนที่ถูกสร้างขึ้นหลังจากบ่มเป็นเวลา 0 2 และ 4 ชั่วโมง โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 50 µM HMP, 50 µM HET-P, 10 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$ และสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดโปรตีนปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร

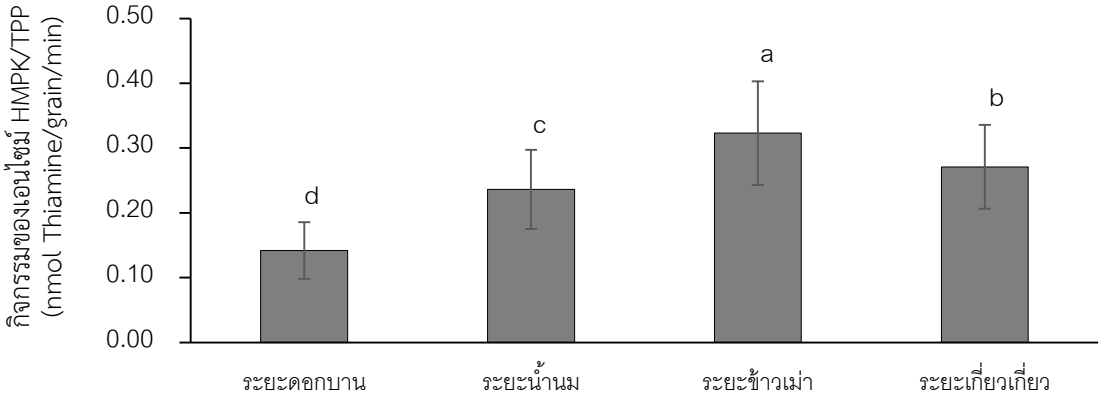
การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ในเมล็ดข้าวที่ระยะการพัฒนาของเมล็ดทั้ง 4 ระยะเมื่อพิจารณาบนพื้นฐานของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ พบว่า ในระยะดอกบานกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP น้อยที่สุด และมีกิจกรรมสูงขึ้นและสูงที่สุดในระยะข้าวเม่าจากนั้นลดลงในระยะเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 4-12) เมื่อเปรียบเทียบในข้าวทั้ง 6 พันธุ์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP มีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกัน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ในเมล็ดทั้ง 4 ระยะมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งแต่ละระยะมีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยในข้าว 6 พันธุ์ เท่ากับ 0.14, 0.24, 0.32 และ 0.28 นาโนโมลไทอะมีน/นาที/มิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ (ภาพที่ 4-13) (ตารางผนวกที่ 12 และ 13)

เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ในเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์ พบว่า ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีกิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุดและพันธุ์พิษณุโลก 2 มีกิจกรรมมากที่สุดเฉลี่ยใน 4 ระยะมีค่าเท่ากับ 0.13 และ 0.46 นาโนโมลไทอะมีน/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 14 และ 15)

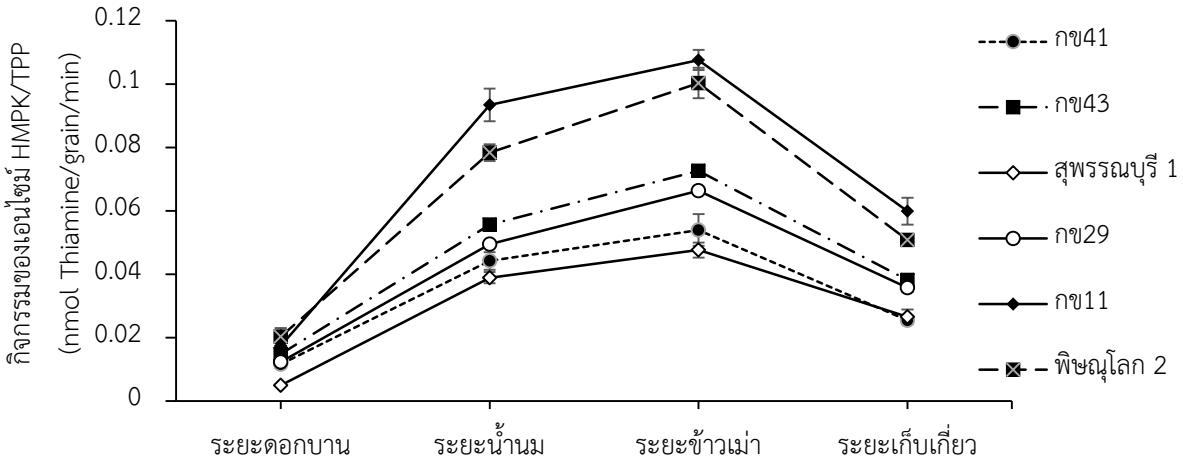


ภาพที่ 4-12 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/ Thiamine-phosphate pyrophosphorylase (HMPK/TPP) ในเมล็ดข้าวที่พัฒนาในแต่ละระยะของข้าว 6 พันธุ์ เมื่อคำนวณต่อปริมาณโปรตีน (แถบความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE)

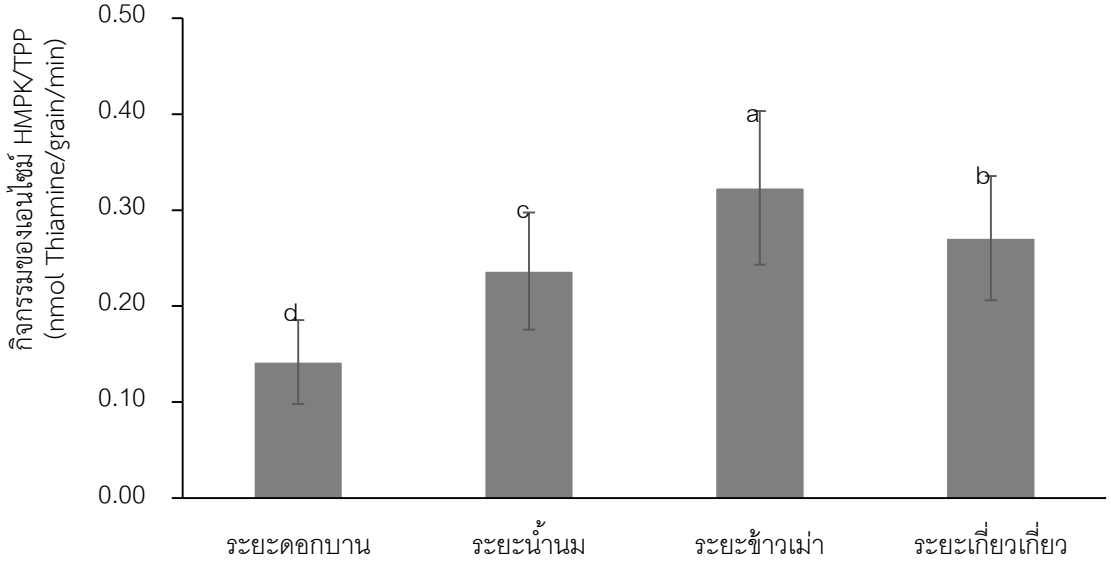


ภาพที่ 4-13 กิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine-phosphate pyrophosphorylase เฉลี่ยในข้าว 6 พันธุ์ที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด (แถบความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE; ตัวอักษรโรมันเหนือแท่งกราฟแสดงความแตกต่างของข้อมูลเมื่อทดสอบโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test (P≤0.05))

เมื่อทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ในเมล็ดข้าวที่ระยะการพัฒนาของเมล็ดทั้ง 4 ระยะโดยพิจารณากิจกรรมของเอ็นไซม์ต่อเมล็ด พบว่า ในระยะดอกบานกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP น้อยที่สุด จากนั้นจะเพิ่มขึ้นในระยะน้ำนมและมีกิจกรรมมากที่สุดในระยะข้าวเม่า เมื่อเมล็ดเข้าสู่ระยะเก็บเกี่ยวกิจกรรมของเอ็นไซม์จะลดลง เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า กิจกรรมของเอ็นไซม์ HMPK/TPP ในเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์และแต่ละระยะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 4-14)(ตารางผนวกที่ 16 และ 17) และเมื่อพิจารณาในภาพรวมพบว่า ระยะข้าวเม่าเป็นระยะที่ข้าวทั้ง 6 พันธุ์มีการแสดงออกของเอ็นไซม์มากที่สุด รองลงไปได้แก่ ระยะเก็บเกี่ยว ระยะน้ำนมและระยะดอกบาน ตามลำดับ (ภาพที่ 4-15)



ภาพที่ 4-14 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/ Thiamine-phosphate pyrophosphorylase ในแต่ละระยะการพัฒนาของข้าว 6 พันธุ์ เมื่อคำนวณต่อเมล็ด (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE)



ภาพที่ 4-15 กิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/Thiamine-phosphate pyrophosphorylase (HMPK/TPP) เฉลี่ยในข้าว 6 พันธุ์ที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด (แถบความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE; ตัวอักษรโรมันเหนือแท่งกราฟแสดงความแตกต่างของข้อมูลเมื่อทดสอบโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test ($p \leq 0.05$))

บทที่ 5
อภิปรายผลและสรุป

อภิปรายผล

ตอนที่ 1 การศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในข้าวไทย

การศึกษาปริมาณไทอะมีนในเมล็ดข้าว โดยการปลูกข้าว 30 พันธุ์ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน และเก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อรวงสุก นำผลผลิตที่ได้ไปชั่งหาน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือก 1,000 เมล็ด ซึ่งพบว่ามีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 21.85-29.78 กรัม และมีน้ำหนักข้าวกล้องอยู่ระหว่าง 16.90-25.89 กรัม ซึ่งมีค่าใกล้เคียงค่ามาตรฐานน้ำหนักของข้าวเปลือก 1,000 เมล็ด เท่ากับ 25 กรัม และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักของพันธุ์ สุพรรณบุรี1 สุพรรณบุรี60 และปทุมธานี1 ที่รายงานว่ามีน้ำหนัก 23.04 24.98 และ 23.92 กรัมตามลำดับ (เทพสุดา รุ่งรัตน์ และคณะ, 2553) โดยในการทดลองนี้ได้ผลผลิตจากพันธุ์ดังกล่าวที่มีน้ำหนัก 1000 เมล็ด เท่ากับ 24.42 25.50 และ 23.05 กรัม ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่ามีความใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าวิธีการปลูกและผลผลิตที่ได้มีมาตรฐานเพียงพอที่จะใช้ในการนำไปศึกษาหาปริมาณไทอะมีนในเมล็ดในการทดลองต่อไป

เมื่อนำเมล็ดข้าวทั้ง 30 พันธุ์มาทำการบดและสกัดด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำไปหาปริมาณไทอะมีนด้วยวิธีทางสเปคโตรโฟโตเมตรี พบว่า มีปริมาณไทอะมีนรวมอยู่ระหว่าง 0.144-0.447 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยมีไทอะมีนรวมเฉลี่ยเท่ากับ 0.274 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งปริมาณไทอะมีนที่วิเคราะห์ได้มีผลสอดคล้องกับ ผาณิต และคณะ (2555) ที่รายงานปริมาณไทอะมีนในข้าว 9 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดา ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวหอมอุบล ข้าวสินเหล็ก ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวเล้าแตก และข้าวหอมกัญญา ที่มีปริมาณไทอะมีนอยู่ในช่วง 0.16-0.32 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และ Prasad *et al.* (2018) ศึกษาในข้าวอินเดีย 11 พันธุ์ พบว่ามีปริมาณไทอะมีนอยู่ระหว่าง 0.12-0.19 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และ Deepa *et al.* (2008) ศึกษาปริมาณไทอะมีนในข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Njavara Jyothi และ IR 64 มีปริมาณไทอะมีน 0.52 0.34 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และสำหรับการทดลองนี้เมื่อพิจารณาข้อมูลทางสถิติ พบว่า ข้าว 5 พันธุ์ ได้แก่ กข7 กข15 กข23 กข41 และกข43 มีปริมาณไทอะมีนสูงที่สุด และข้าวพันธุ์ กข11 กข 31 และพิษณุโลก2 จัดอยู่ในกลุ่มข้าวที่มีปริมาณไทอะมีนต่ำที่สุด (ภาพที่ 4-2) ซึ่งหากพิจารณาจากข้าวที่นำมาศึกษามีความผันแปรของปริมาณไทอะมีนสูง โดยพบว่าพันธุ์ที่มีปริมาณไทอะมีนต่ำที่สุด (พิษณุโลก 2) มีปริมาณไทอะมีนน้อยกว่าพันธุ์ที่มีปริมาณไทอะมีนสูง (กข41) ถึง 3 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณไทอะมีนสูงขึ้น อย่างไรก็ตามหากพิจารณาในแง่สุขภาพแล้ว มนุษย์ควรได้รับไทอะมีนวันละ 1-1.5 มิลลิกรัม ดังนั้นการเลือก

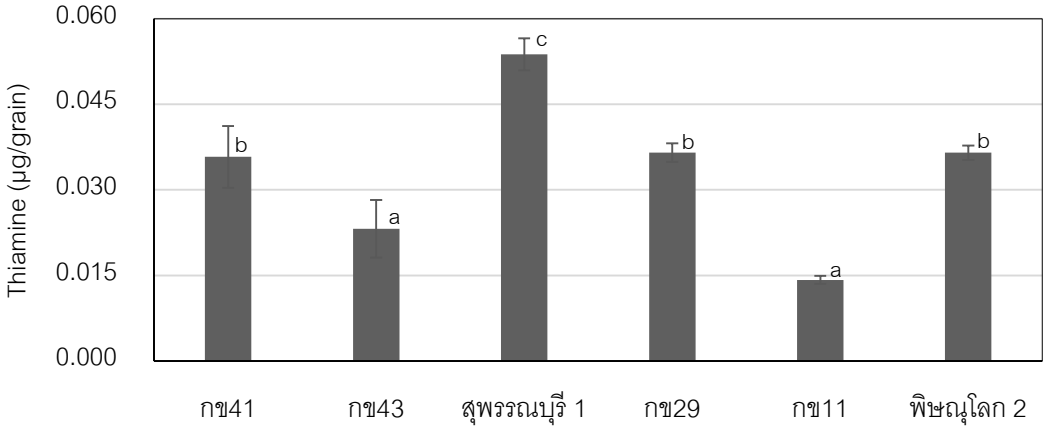
รับประทานข้าวพันธุ์กข41 อาจทำให้สามารถลดปริมาณแป้งที่จะได้รับลงประมาณ 3 เท่าเช่นกัน ซึ่งเป็นผลดีต่อผู้ป่วยโดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเบาหวาน เมื่อเปรียบเทียบกับการเลือกรับประทานข้าวพันธุ์พิษณุโลก2 ทั้งนี้ในการพิจารณานี้อาศัยข้อมูลจากข้าวกล้องเท่านั้น ซึ่งมีรายงานด้วยว่าการขัดล้างข้าว การใช้ความร้อนในการหุงข้าวมีผลให้ปริมาณไทอะมีนลดลง (Chitpan *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามจากการทดลองทำให้พิจารณาได้ว่าพันธุกรรมของข้าวเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ข้าวแต่ละพันธุ์มีปริมาณไทอะมีนแตกต่างกัน ทั้งนี้มีรายงานว่า นอกจากพันธุกรรมแล้วสภาพแวดล้อมที่พืชเจริญเติบโต เช่น ปริมาณน้ำในดิน ความเค็มมีผลต่อการสังเคราะห์ไทอะมีนของพืช (El-Shintinawy & El-Shourbagy, 2001; Rapala-Kozik *et al.*, 2008) และการที่ข้าวมีการสะสมไทอะมีนมากที่ชั้นรำข้าวและเอ็มบริโอ (bran layer and embryo) ประมาณ 80% และพบในเอ็นโดสเปิร์มประมาณ 20% (Zheng & Chen, 2017) ดังนั้นข้าวแต่ละพันธุ์มีปริมาณไทอะมีนแตกต่างกันอาจมีสาเหตุจากโครงสร้างของเมล็ดด้วย เช่น ความกว้าง ความยาว น้ำหนักเมล็ด (Song *et al.*, 2007) ความหนาชั้นรำ (Rohrer & Siebenmorgen, 2004) ขนาดของเอ็มบริโอ (K. L. Liu *et al.*, 2017) เป็นต้น

ตอนที่ 2 การศึกษาปริมาณวิตามินบี 1 ในแต่ละระยะการเจริญของเมล็ด

จากการทดลองหาปริมาณไทอะมีนในข้าวกล้อง 30 พันธุ์ ได้ทำการคัดเลือกข้าวจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ กลุ่มที่มีไทอะมีนสูง (กข41 และ กข43 (มีปริมาณไทอะมีน 0.047 และ.428 mg/100g ตามลำดับ) กลุ่มที่มีไทอะมีนปานกลาง (สุพรรณบุรี 1 และ กข29 (มีปริมาณไทอะมีน 0.255 และ 0.253 mg/100g ตามลำดับ) กข11 และพิษณุโลก 2 (0.198 และ 0.144 mg/100g ตามลำดับ) เพื่อใช้ในการทดลองตอนที่ 2 โดยทำการปลูกข้าวและเก็บตัวอย่างในระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่า และระยะเก็บเกี่ยว พบว่าเมื่อเมล็ดมีพัฒนาการการสะสมไทอะมีนในเมล็ดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย ในระยะดอกบานมีปริมาณไทอะมีนน้อยที่สุด และหลังจากนั้นจึงมีการสร้างและสะสมปริมาณไทอะมีนเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนม จากนั้นจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนถึงระยะเก็บเกี่ยวซึ่งเป็นระยะที่พบปริมาณของไทอะมีนมากที่สุดในข้าวพันธุ์ กข41 กข43 สุพรรณบุรี 1 กข29 และกข11 ส่วนพันธุ์พิษณุโลก 2 มีปริมาณไทอะมีนสูงที่สุดในระยะน้ำนม และมีปริมาณลดลงในระยะข้าวเม่าจากนั้นปริมาณจะคงที่จนกระทั่งถึงระยะเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 4-5) จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Shimizu *et al.* (1990) ที่พบว่าการสร้างของไทอะมีนในเมล็ดข้าว Nihonbare ในระยะหลังจากดอกบาน มีปริมาณไทอะมีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วประมาณ 50 นาโนกรัม/เมล็ด ที่อายุ 10 วันหลังดอกบานจนถึง 30 วันหลังดอกบานจากนั้นปริมาณจะคงที่จนกระทั่งถึงอายุ 50 วันหลังดอกบาน ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าข้าว 4 พันธุ์ ได้แก่ กข41 กข43 สุพรรณบุรี 1 กข29 มีการเพิ่มขึ้นของไทอะมีนในระยะดอกบานจนถึงระยะน้ำนมมากที่สุด และค่อนข้างคงที่หรือเพิ่มเพียงเล็กน้อย ส่วนพันธุ์ กข11 และพิษณุโลก 2 มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไทอะมีนในระหว่างการเจริญของผลข้าวอย่างต่อเนื่อง ซึ่ง Roje (2007) รายงานมีเอ็นไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอะมีนในพลาสติด เช่น เอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีนไคเนส (HMP

kinase) ที่ถอดรหัสจากยีน *THIC* ใน Arabidopsis มีรายงานว่าพบการทำงานของโปรตีน THIC อยู่บริเวณสโตรมาของคลอโรพลาสต์ (Goyer, 2010) thiamin-phosphate pyrophosphorylase ซึ่งพบว่ามีกิจกรรมอยู่ในพลาสติด (Belanger et al., 1995) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าในระยะดอกบานถึงระยะข้าวเม่าที่ประกอบด้วย กาบดอกล่าง (lemma) กาบดอกบน (palea) และเมล็ด (grain) ที่ยังคงมีสีเขียวของคลอโรพลาสต์ จึงมีการสังเคราะห์ไทอะมีนได้มาก แต่เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยว ซึ่งมีการสลายของคลอโรฟิลล์อาจมีผลต่อการทำงานของคลอโรพลาสต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Shimizu et al. (1990) ที่ทำการทดลองและพบว่ามีการสะสมไทอะมีนในระหว่างการเจริญของเมล็ดข้าว และพบว่าการสะสมเพิ่มขึ้นมากในช่วงที่ผลข้าว (grain) มีสีเขียว

เมื่อพิจารณาการเพิ่มขึ้นของปริมาณไทอะมีน พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไทอะมีนแตกต่างกัน (ภาพที่ 5-1) นอกจากนี้พบว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีอัตราการสร้างไทอะมีนในเมล็ด (grain) ไม่เท่ากันส่งผลให้ปริมาณไทอะมีนในระยะเก็บเกี่ยวของข้าวทั้ง 6 พันธุ์แตกต่างกัน โดยหากพิจารณาจากปริมาณไทอะมีนในระยะเก็บเกี่ยวจะเห็นได้ว่าข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีปริมาณไทอะมีนสูงถึง 0.089 ไมโครกรัมต่อเมล็ดแต่ในระยะดอกบานมีปริมาณไทอะมีน 0.035 ไมโครกรัมต่อเมล็ด แสดงให้เห็นว่าปริมาณไทอะมีนในระยะเก็บเกี่ยวไม่ได้มีผลมาจากปริมาณไทอะมีนตั้งต้นในระยะดอกบานแต่อาจเกิดจากอัตราการสร้างและสะสมไทอะมีนของข้าวแต่ละพันธุ์แตกต่างกันซึ่งพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีอัตราการสะสมไทอะมีนเพิ่มขึ้นมากที่สุดโดยเพิ่มขึ้นถึง 0.054 ไมโครกรัมต่อเมล็ด รองลงมาได้แก่ พันธุ์กข29 พิษณุโลก 2 กข41 กข43 และกข11 มีการสะสมไทอะมีนเพิ่มขึ้นเพียง 0.037, 0.037, 0.036, 0.023 และ 0.014 ไมโครกรัมต่อเมล็ดตามลำดับ (ภาพที่ 5-1) สอดคล้องกับ Watanabe et al. (2004) ที่รายงานว่าเมล็ดข้าวสาลีที่อยู่ในระยะพัฒนาระหว่างอายุ 0-6 สัปดาห์หลังจากดอกบานมีไทอะมีนเพิ่มขึ้นประมาณ 0.028 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ดังนั้นอัตราการสร้างและสะสมไทอะมีนของข้าวแต่ละพันธุ์เป็นเรื่องที่ควรศึกษาต่อไป รวมทั้งรูปแบบพัฒนาการของโครงสร้างผลหลังดอกได้รับการผสมอาจมีส่วนสำคัญในการสร้างและสะสมไทอะมีนในเมล็ดข้าว



ภาพที่ 5-1 ปริมาณไทอะมีนที่เพิ่มขึ้นจากระยะดอกบานถึงระยะเก็บเกี่ยว (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; ตัวอักษรโรมันแสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ทดสอบความแตกต่างของ ค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT (P≤0.05))

ตอนที่ 3 การศึกษากิจกรรมของโปรตีน Hydroxymethylpyrimidine kinase/ Thiamine-phosphate pyrophosphorylase (HMPK/TPP) ในระหว่างการเจริญของเมล็ด

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ในเมล็ดข้าวที่มีพัฒนาการในระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่า และระยะเก็บเกี่ยว พบว่าเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาหลังจากดอกบานกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อเมล็ดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ในระยะน้ำนมและสูงที่สุดในระยะข้าวเม่า จากนั้นมีกิจกรรมลดลงในระยะเก็บเกี่ยว (0.004, 0.017, 0.020 และ 0.010 ไมโครกรัมไทอะมีนต่อเมล็ดต่อนาที ตามลำดับ) ซึ่ง Belanger *et al.* (1995) รายงานว่าการสังเคราะห์ไทอะมีนจะเกิดมากในช่วงที่เมล็ดมีสีเขียว เนื่องจากพบว่ากระบวนการสังเคราะห์ไทอะมีนเกิดขึ้นในพลาสติด สังเกตได้ว่าในระยะน้ำนมและระยะข้าวเม่ามีการทำงานของเอนไซม์และมีการสะสมไทอะมีนสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและเป็นระยะที่กาบดอกข้าวมีสีเขียว โดยเฉพาะในระยะข้าวเม่าที่พบว่าทั้งกาบดอกและเมล็ดมีสีเขียวก่อนที่จะค่อย ๆ ลดลงในระหว่างการเจริญเข้าสู่ระยะเก็บเกี่ยวที่ทั้งกาบดอกและเมล็ดข้าวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ทั้งนี้ในกระบวนการงอกของเมล็ดต้องการไทอะมีนสำหรับเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและ pentose-phosphate pathway (Golda *et al.*, 2004) ดังนั้นเมล็ดอาจต้องเร่งสร้างและสะสมไทอะมีนให้เพียงพอเมื่อเข้าสู่ ระยะเก็บเกี่ยวซึ่งเมล็ดกำลังเข้าสู่ระยะพักกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ซึ่งเห็นได้ว่าในระยะนี้มีกิจกรรมลดลงถึง 50% จากระยะข้าวเม่าขณะที่ปริมาณไทอะมีนในระยะเก็บเกี่ยวสูงที่สุด เนื่องจากไทอะมีนเป็นรูปที่สะสมเมื่อเมล็ดพักตัวโดยจับอยู่กับโปรตีนจำเพาะ (thiamin-binding protein) Shimizu *et al.* (1990) รายงานว่าในข้าวกิจกรรมการจับของไทอะมีนจะเพิ่มขึ้นหลังจากระยะดอกบาน

10 วันและคงที่หลังจากดอกบาน 30 วันเป็นไปในทางเดียวกับการเพิ่มขึ้นของไทอะมีนชัดเจนว่าการเพิ่มขึ้นของโปรตีนเพื่อให้เพียงพอต่อปริมาณไทอะมีนที่สร้างขึ้นระหว่างที่มีพัฒนาการของเมล็ด ซึ่งการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่จับกับไทอะมีนในชั้นรำของข้าวและเมล็ดบักวีทแสดงให้เห็นว่า thiamin-binding protein มีความจำเพาะกับไทอะมีนอิสระ และไม่สามารถจับกับไทอะมีนมอนอฟอสเฟต หรือไทอะมีนไพโรฟอสเฟตได้ (Shimizu *et al.*, 1990) จึงทำให้ในระยะเก็บเกี่ยวเมล็ดจะเปลี่ยนอนุพันธุ์ของไทอะมีน เป็นไทอะมีนอิสระสำหรับจับกับโปรตีนเพื่อสะสมในระยะพักตัวและเพื่อนำไปใช้สำหรับการงอกของเมล็ด (Watanabe *et al.*, 2004) โดยเมื่อเมล็ดได้รับความชื้นอย่างเพียงพอกระบวนการงอกจะเริ่มขึ้น และไทอะมีนที่สะสมอยู่จะถูกเปลี่ยนเป็นไทอะมีนไพโรฟอสเฟต ซึ่งมีบทบาทสำคัญในวิถีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตเพื่อสร้างพลังงาน สังเคราะห์น้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม รวมถึงการสร้างสารตัวกลางในวิถีไกลโคไลซีส (Rapala-Kozik *et al.*, 2011) ซึ่ง Golda *et al.* (2004) พบว่าในธัญพืช ปริมาณไทอะมีนจะเริ่มลดลงหลังจากที่เมล็ดงอกแล้วเป็นเวลา 3 วันและในพืชตระกูลถั่วปริมาณไทอะมีนจะเริ่มลดลงหลังจากเมล็ดงอกแล้ว 6 วัน ขณะที่ปริมาณไทอะมีนไพโรฟอสเฟตพบว่ามีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น Rapala-Kozik *et al.* (2009) รายงาน ว่าในเมล็ดข้าวโพดที่กำลังงอกเป็นเวลา 5 วันมีกิจกรรมของเอนไซม์ TMP synthase และ TPK สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ในข้าว 6 พันธุ์มีกิจกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 0.26 นาโนโมลไทอะมีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาทีซึ่งต่ำกว่ารายงานในต้น กล้าข้าวโพดและในยีสต์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (0.60 และ 0.61 นาโนโมลไทอะมีนต่อนาทีต่อ มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ) (Y. Kawasaki, 1993; Rapala-Kozik *et al.*, 2008) เนื่องจากในการทดลองนี้ ใช้สารตั้งต้นในการศึกษาคือไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีน (HMP) แทนไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีนโมโนฟอสเฟต (HMP-P) ซึ่ง Rapala-Kozik *et al.* (2007) รายงานว่าโปรตีน THI3 ในข้าวโพดซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีนในข้าว 77 เปอร์เซ็นต์สามารถสังเคราะห์ไทอะมีนโมโนฟอสเฟตได้จากสารตั้งต้นคือ HMP รวมกับ HET-P เมื่อมีแมกนีเซียมไอออนเป็นโคแฟกเตอร์ เช่นเดียวกับโปรตีน BTH1 ในผักกาด (Kim *et al.*, 1998) เนื่องจากเป็น โปรตีนที่ทำหน้าที่ได้ทั้งการเติมฟอสเฟตให้ HMP และกระตุ้นการรวมกันของวงแหวน thiazole และ pyrimidine แต่ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะต่ำกว่าการใช้ HMP-P เป็นสารตั้งต้นประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ อาจเป็นเพราะการศึกษาข้าวโพดในระยะต้นกล้าต้องการไทอะมีนเพื่อสร้างพลังงานสำหรับเจริญเติบโตทำให้การทำงานของเอนไซม์ TPP สูงกว่าในเมล็ดข้าวที่กำลังเข้าสู่ ระยะพักตัว จากข้อมูลดังกล่าวเห็นถึงความผันแปรของไทอะมีนและกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าวเป็นไปได้ว่าหากสามารถเพิ่มการทำงานของ เอนไซม์ให้สูงขึ้นอาจทำให้ปริมาณไทอะมีนที่สะสมในเมล็ดสูงขึ้นได้ นอกจากนี้ ความผันแปรของไทอะมีนยังเกิดได้จากปัจจัยอื่น ๆ เช่น สภาพแวดล้อมในการปลูก (Goyer & Haynes, 2011; Witten & Aulrich, 2018) และความเครียดจากปัจจัยต่าง ๆ (Rapala-Kozik *et al.*, 2008) ดังนั้นการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ อาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนาไปสู่ ความก้าวหน้าในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณไท อามีนในเมล็ดเพิ่มขึ้นเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับข้าวไทยต่อไป

สรุป

การศึกษาปริมาณไทอะมีนในข้าว 30 พันธุ์ พบว่ามีความผันแปรของปริมาณไทอะมีนอยู่ระหว่างระหว่าง 0.144-0.447 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยมีไทอะมีนรวมเฉลี่ยเท่ากับ 0.274 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่ำที่สุดในระยะดอกบาน จากนั้นกิจกรรมจะเพิ่มขึ้นจนถึงระยะข้าวเม่า และลดลงในระยะเก็บเกี่ยว แต่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP สอดคล้องกับปริมาณไทอะมีนที่ตรวจได้ ยกเว้นในระยะเก็บเกี่ยวที่มีกิจกรรมของเอ็นไซม์ลดลง จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการที่จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีการสร้างและสะสมไทอะมีนมากขึ้นเนื่องจากมีความผันแปรของปริมาณไทอะมีนมากถึง 3 เท่า

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาในข้าวพันธุ์อื่น ๆ
2. ควรมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างเมล็ดและปริมาณไทอะมีน
3. ควรมีการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการะบวนการสังเคราะห์ไทอะมีน
4. ควรมีการปรับปรุงพันธ์เพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีไทอะมีนสูงเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการต่อไป

บรรณานุกรม

ผาณิต รุจิรพิสิฐ, วิชชุดา สังข์แก้ว, และ เสาวนีย์ เอี้ยวสกุลรัตน์. (2555). คุณค่าทางโภชนาการของข้าว 9 สายพันธุ์. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 43* (2): 173-176

นภา หลิมรัตน์ (2555) วิตามินและโคเอมไซม์ (Vitamin and Coenzyme). *In*: ตำราชีวเคมี. คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น,

Aguilar, F., Charrondiere, U. R., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D. M., Grilli, S., Guertler, R., Kass, G. E. N., Koenig, J., Lambré, C., Larsen, J.-C., Leblanc, J.-C., Mortensen, A., Parent-Massin, D., Pratt, I., Rietjens, I., Stankovic, I., Tobback, P., Verguieva, T., & Woutersen, R. (2008). Benfotiamine, thiamine monophosphate chloride and thiamine pyrophosphate chloride, as sources of vitamin B1 added for nutritional purposes to food supplements. *The EFSA Journal, 864*, 1-31.

Ajjawi, I., Tsegaye, Y., & Shintani, D. (2007). Determination of the genetic, molecular, and biochemical basis of the Arabidopsis thaliana thiamin auxotroph th1. *Arch Biochem Biophys, 459*(1), 107-114. doi:10.1016/j.abb.2006.11.011

Ba, A. (2008). Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell Molecular Neurobiology*(28), 923–931.

Batifoulier, F., Verny, M. A., Chanliaud, E., Remesy, C., & Demigne, C. (2006). Variability of B vitamin concentrations in wheat grain, milling fractions and bread products. *European Journal of Agronomy, 25*(2), 163-169. doi:10.1016/j.eja.2006.04.009

Belanger, F. C., Leustek, T., Chu, B., & Kriz, A. L. (1995). Evidence for the thiamine biosynthetic pathway in higher-plant plastids and its developmental regulation. *Plant Mol Biol, 29*(4), 809-821.

Buchholz, M., Drotleff, A. M., & Ternes, W. (2012). Thiamin (vitamin B1) and thiamin phosphate esters in five cereal grains during maturation. *Journal of Cereal Science, 56*, 109-114.

Champe, P. C., Harvey, R. A., & Ferrier, D. R. (2008). *Biochemistry* (4 ed.). U.S.A: Lippincott Williams and Wilkins.

Chatterjee, A., Jurgenson, C. T., Schroeder, F. C., Ealick, S. E., & Begley, T. P. (2007). Biosynthesis of thiamin thiazole in eukaryotes: conversion of NAD to an advanced intermediate. *J Am Chem Soc, 129*(10), 2914-2922. doi:10.1021/ja067606t

Chitpan, M., Chavasit, V., & Kongkachuichai, R. (2005). Development of fortified dried broken rice as a complementary food. *Food and Nutrition Bulletin, 26*(4), 376-384.

Dawe, D. (2000). The contribution of rice research to poverty alleviation. *Studies in Plant Science, 7*, 3-12.

Deepa, N. G., Singh, V., & Naidu, K. A. (2008). Nutrient composition and physicochemical properties of Indian medicinal rice. *Food Chemistry, 106*, 165–171.

El-Shintinawy, F., & El-Shourbagy, M. N. (2001). Alleviation of changes in protein metabolism in NaCl-stressed wheat seedlings by thiamine. *Biologia Plantarum, 44*(4), 541–545.

Golda, A., Szyniarowski, P., Ostrowska, K., Kozik, A., & Rapala-Kozik, M. (2004). Thiamine binding and metabolism in germinating seeds of selected cereals and legumes. *Plant Physiology and Biochemistry, 42*(3), 187-195. doi:10.1016/j.plaphy.2004.01.002

Goyer, A. (2010). Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry, 71*(14-15), 1615-1624.

Goyer, A., & Haynes, K. G. (2011). Vitamin B-1 content in cotato: Eeffect of genotype, tuber enlargement, and storage, and estimation of stability and broad-sense heritability. *American Journal of Potato Research, 88*(4), 374-385. doi:10.1007/s12230-011-9203-6

Hohmann, S., & Meacock, P. A. (1998). Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast Saccharomyces cerevisiae: genetic regulation. *Biochim Biophys Acta, 1385*(2), 201-219.

K. L. Liu, Zheng, J. B., & Chen, F. S. (2017). Relationships between degree of milling and loss of Vitamin B, minerals, and change in amino acid composition of brown rice. *Food Science and Technology, 82*, 429-436. doi:10.1016/j.lwt.2017.04.067

Kawasaki, Y. (1993). Copurification of hydroxyethylthiazole kinase and thiamine-phosphate pyrophosphorylase of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of hydroxyethylthiazole kinase as a bifunctional enzyme in the thiamine biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology, 175*(16), 5153-5158.

Kawasaki, Y., Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H., & Iwashima, A. (1990). Regulation of thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology, 172*(10), 6145-6147.

Kim, Y. S., Nosaka, K., Downs, D. M., Kwak, J. M., Park, D., C., K., & Nam, H. G. (1998). A Brassica cDNA clone encoding a bifunctional hydroxymethylpyrimidine kinase/thiamin-phosphate pyrophosphorylase involved in thiamin biosynthesis. *Plant Molecular Biology, 37*(6), 955-966. doi:10.1023/a:1006030617502

Lebiedzinska, A., & Szefer, P. (2006). Vitamins B in grain and cereal-grain food, soy-products and seeds. *Food Chemistry, 95*(1), 116-122. doi:10.1016/j.foodchem.2004.12.024

Leichssenring, G., & Schmidt, J. (1962). Über die Synthese von Thiamin-phosphorsäureestern. *Chemische Berichte, 95*(3), 767-772.

Liu, S., Zhang, Z., Liu, Q., Luo, H., & Zheng, W. (2002). Spectrophotometric determination of vitamin B1 in a pharmaceutical formulation using triphenylmethane acid dyes. *J Pharm Biomed Anal, 30*(3), 685-694.

Moongngarm, A., & Saetung, N. (2010). Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chemistry, 122*(3), 782-788. doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.053

Mundy, J., Hejgaard, J., Hansen, A., Hallgren, L., Jorgensen, K. G., & Munck, L. (1986). Differential synthesis in vitro of barley aleurone and starchy endosperm proteins. *Plant Physiology, 81*, 630-636.

Onozuka, M., Konno, H., Kawasaki, Y., Akaji, K., & Nosaka, K. (2008). Involvement of thiaminase II encoded by the THI20 gene in thiamin salvage of Saccharomyces cerevisiae. *Federation of European Microbiological Societies, 8*(2), 266-275. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00333.x

Pinto, E., Pedersén, M., Snoeijs, P., Van Nieuwerburgh, L., & Colepicolo, P. (2002). Simultaneous Detection of Thiamine and Its Phosphate Esters from Microalgae by HPLC. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 291*(2), 344-348. doi:https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6438

Prasad, V. S. S., Hymavathi, A., Babu, V. R., & Longvah, T. (2018). Nutritional composition in relation to glycemic potential of popular Indian rice varieties. *Food Chemistry, 238*, 29-34. doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.138

Rapala-Kozik, M. (2011). Vitamin B-1 (Thiamine): A Cofactor for Enzymes Involved in the Main Metabolic Pathways and an Environmental Stress Protectant. *Biosynthesis of*

Vitamins in Plants: Vitamins a, B1, B2, B3, B5, Pt A, 58, 37-91. doi:10.1016/B978-0-12-386479-6.00004-4

Rapala-Kozik, M., Golda, A., & Kujda, M. (2009). Enzymes that control the thiamine diphosphate pool in plant tissues. Properties of thiamine pyrophosphokinase and thiamine-(di)phosphate phosphatase purified from Zea mays seedlings. *Plant Physiol Biochem, 47*(4), 237-242. doi:10.1016/j.plaphy.2008.12.015

Rapala-Kozik, M., Kowalska, E., & Ostrowska, K. (2008). Modulation of thiamine metabolism in Zea mays seedlings under conditions of abiotic stress. *Experimental Botany, 59*(15), 4133-4143. doi:10.1093/jxb/ern253

Rapala-Kozik, M., Olczak, M., Ostrowska, K., Starosta, A., & Kozik, A. (2007). Molecular characterization of the thi3 gene involved in thiamine biosynthesis in Zea mays: cDNA sequence and enzymatic and structural properties of the recombinant bifunctional protein with 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (phosphate) kinase and thiamine monophosphate synthase activities. *Biochemical Journal, 408*(2), 149-159. doi:10.1042/bj20070677

Rapala-Kozik, M., Wolak, N., Kujda, M., Banas, A., & Kozik, A. (2011). Biosynthesis and activation of thiamine (vitamin B1) in the response of plants to abiotic stress. *Febs Journal, 278*, 318-318.

Rapala-Kozik, M., Wolak, N., Kujda, M., & Banas, A. K. (2012). The upregulation of thiamine (vitamin B1) biosynthesis in Arabidopsis thaliana seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. *BMC Plant Biol, 12*, 2. doi:10.1186/1471-2229-12-2

Rohrer, C. A., & Siebenmorgen, T. J. (2004). Nutraceutical concentrations within the bran of various rice kernel thickness fractions. *Biosystems Engineering, 88*(4), 453–460

Roje, S. (2007). Vitamin B biosynthesis in plants. *Phytochemistry, 68*(14), 1904-1921.

Shimizu, M., Mitsunaga, T., Inaba, K., Yoshida, T., & Iwashima, A. (1990). Accumulation of thiamine and thiamine-binding protein during development of rice seed. *Journal of Plant Physiology, 137*, 123-124.

Song, X. J., Huang, W., Shi, M., Zhu, M. Z., & Lin, H. X. (2007). A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nature Genetics, 39*, 623–630

Sriram, K., Manzanares, W., & Joseph, K. (2012). Thiamine in nutrition therapy. *Nutrition in Clinical Practice., 27*(1), 41-50.

Tanaka, K., Sugimoto, T., Ogawa, M., & Kasai, Z. (1980). Isolation and Characterization of Two Types of Protein Bodies in the Rice Endosperm. *Agricultural and Biological Chemistry, 44*(7), 1633-1639. doi:10.1080/00021369.1980.10864167

Tunc-Ozdemir, M., Miller, G., Song, L., Kim, J., Sodek, A., Koussevitzky, S., Misra, A. N., Mittler, R., & Shintani, D. (2009). Thiamin Confers Enhanced Tolerance to Oxidative Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology, 151*(1), 421-432. doi:10.1104/pp.109.140046

Wang, G., Ding, X., Yuan, M., Qiu, D., Li, X., Xu, C., & Wang, S. (2006). Dual function of rice OsDR8 gene in disease resistance and thiamine accumulation. *Plant Molecular Biology, 60*(3), 437-449. doi:10.1007/s11103-005-4770-x

Watanabe, K., Nishida, N., Adachi, T., Ueda, M., Mitsunaga, T., & Kawamura, Y. (2004). Accumulation and degradation of thiamin-binding protein and level of thiamin in wheat seeds during seed maturation and germination. *Biosci Biotechnol Biochem, 68*(6), 1243-1248. doi:10.1271/bbb.68.1243

Watanabe, K., Takahashi, H., Ampo, A., & Mitsunaga, T. (2003). Change of thiamin-binding protein and thiamin levels during seed maturation and germination in sesame. *Plant Physiology and Biochemistry, 41*, 973-976.

Witten, S., & Aulrich, K. (2018). Effect of variety and environment on the amount of thiamine and riboflavin in cereals and grain legumes. *Animal Feed Science and Technology, 238*, 39-46. doi:10.1016/j.anifeedsci.2018.01.022

Yazdani, M., Zallot, R., Tunc-Ozdemir, M., de Crecy-Lagard, V., Shintani, D. K., & Hanson, A. D. (2013). Identification of the thiamin salvage enzyme thiazole kinase in Arabidopsis and maize. *Phytochemistry, 94*, 68-73. doi:10.1016/j.phytochem.2013.05.017

Zheng, J., & Chen, F. (2017). Relationships between degree of milling and loss of Vitamin B, minerals, and change in amino acid composition of brown rice. *Food Science and Technology, 82*, 429-436. doi:10.1016/j.lwt.2017.04.067

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือก 1000 เมล็ดของข้าว 30 พันธุ์

	Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	381.570	29	13.158	5.397	.000
Within Groups	219.431	90	2.438		
Total	601.000	119			

ตารางผนวกที่ 2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือก 1000 เมล็ดของข้าว 30 พันธุ์ ด้วยวิธี DMRT

พันธุ์	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Suphan Buri 2	4	21.85									
RD 49	4	22.39	22.39								
Phatthalung	4	22.70	22.70	22.70							
Patumtani 1	4	23.04	23.04	23.04	23.04						
RD 15	4	23.80	23.80	23.80	23.80	23.80					
Suphan Buri 90	4	23.81	23.81	23.81	23.81	23.81					
Hom Dang	4	23.87	23.87	23.87	23.87	23.87					
RD 7	4	23.88	23.88	23.88	23.88	23.88					
RD 41	4	24.12	24.12	24.12	24.12	24.12					
Chainat 1	4	24.30	24.30	24.30	24.30	24.30					
Suphan Buri 1	4	24.41	24.41	24.41	24.41	24.41					
Leuang Bpra Tiw	4	24.43	24.43	24.43	24.43	24.43					
RD 9	4	24.43	24.43	24.43	24.43	24.43					
RD 29	4		24.58	24.58	24.58	24.58	24.58				
Suphan Buri 3	4		24.79	24.79	24.79	24.79	24.79	24.79			
Chainat 2	4		24.83	24.83	24.83	24.83	24.83	24.83			
Khao Jow Hawm Suphan Buri	4			25.12	25.12	25.12	25.12	25.12			
RD 31	4			25.21	25.21	25.21	25.21	25.21			
RD 23	4			25.38	25.38	25.38	25.38	25.38			
Suphan Buri 60	4				25.49	25.49	25.49	25.49	25.49		
RD 1	4				25.66	25.66	25.66	25.66	25.66		
RD 11	4				25.66	25.66	25.66	25.66	25.66		
Phitsanulok 2	4					25.82	25.82	25.82	25.82		
RD 3	4					26.17	26.17	26.17	26.17		
Khao Dawk Mali 105	4					26.31	26.31	26.31	26.31		
Lon Yung	4						27.16	27.16	27.16	27.16	
Leuang On	4							27.41	27.41	27.41	27.41
RD 43	4								28.01	28.01	28.01
Khao Jow Hawm Khlond Luang 1	4									28.83	28.83
Khaw Ta Hwin	4										29.77
Sig.		.056	.073	.050	.058	.071	.056	.052	.055	.173	.052

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักเมล็ดข้าวกล้อง 1000 เมล็ดของข้าว 30 พันธุ์

	Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.504	29	.017	7.220	.000
Within Groups	.217	90	.002		
Total	.721	119			

ตารางผนวกที่ 4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเมล็ดข้าวกล้อง 1000 เมล็ดของข้าว 30 พันธุ์ ด้วยวิธี DMRT

พันธุ์	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RD15	4	16.90											
Phatthalung	4	17.07	17.07										
RD7	4	17.17	17.17	17.17									
Suphan Buri 2	4	17.24	17.24	17.24									
RD23	4	17.54	17.54	17.54	17.54								
RD49	4	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00							
Suphan Buri 1	4	18.21	18.21	18.21	18.21	18.21							
Patumtani 1	4	18.37	18.37	18.37	18.37	18.37	18.37						
RD41	4	18.64	18.64	18.64	18.64	18.64	18.64						
RD1	4	19.14	19.14	19.14	19.14	19.14	19.14	19.14					
RD9	4	19.38	19.38	19.38	19.38	19.38	19.38	19.38					
Suphan Buri 90	4	19.54	19.54	19.54	19.54	19.54	19.54	19.54					
Hom Dang	4		19.73	19.73	19.73	19.73	19.73	19.73	19.73				
RD29	4		19.75	19.75	19.75	19.75	19.75	19.75	19.75				
RD31	4			19.90	19.90	19.90	19.90	19.90	19.90				
Hawm Suphan Buri	4			19.93	19.93	19.93	19.93	19.93	19.93				
Chainat 1	4				20.08	20.08	20.08	20.08	20.08				
Suphan Buri 60	4				20.18	20.18	20.18	20.18	20.18				
Suphan Buri 3	4				20.20	20.20	20.20	20.20	20.20				
Leuang Bpra Tiw	4				20.32	20.32	20.32	20.32	20.32	20.32			
Khao Dawk Mali 105	4				20.33	20.33	20.33	20.33	20.33	20.33			
RD3	4				20.34	20.34	20.34	20.34	20.34	20.34			
Chainat 2	4					20.70	20.70	20.70	20.70	20.70			
Phitsanulok 2	4						21.06	21.06	21.06	21.06	21.06		
RD43	4							21.60	21.60	21.60	21.60	21.60	
Leuang On	4								22.36	22.36	22.36	22.36	
RD11	4									22.97	22.97	22.97	
Hawm Khlond Luang 1	4										23.49	23.49	23.49
Lon Yung	4											24.00	24.00
Khaw Ta Hwin	4												25.89
Sig.		.060	.058	.052	.052	.061	.060	.085	.064	.051	.063	.066	.052

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไทอะมีนในข้าวกล้อง 30 พันธุ์

	Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.504	29	.017	7.220	.000
Within Groups	.217	90	.002		
Total	.721	119			

ตารางผนวกที่ 6 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไทอะมีนในเมล็ดข้าว 30 พันธุ์ ด้วยวิธี DMRT

พันธุ์	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
พิษณุโลก 2	4	.144								
กข11	4	.198	.198							
กข31	4	.199	.199							
ชัยนาท 1	4	.217	.217	.217						
เหลืองประทิว	4	.219	.219	.219						
กข9	4		.227	.227	.227					
หอมแดง	4		.228	.228	.228					
ขาวตาหวิน	4		.229	.229	.229					
เหลืองอ่อน	4		.230	.230	.230					
ล้นยุ้ง	4		.238	.238	.238					
ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 1	4		.240	.240	.240					
สุพรรณบุรี 2	4		.249	.249	.249	.249				
กข29	4		.253	.253	.253	.253				
กข3	4		.253	.253	.253	.253				
สุพรรณบุรี 1	4		.255	.255	.255	.255				
ขาวดอกมะลิ 105	4		.272	.272	.272	.272				
ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี	4		.274	.274	.274	.274				
สุพรรณบุรี 60	4		.276	.276	.276	.276				
สุพรรณบุรี 3	4			.284	.284	.284	.284			
ปทุมธานี 1	4			.286	.286	.286	.286			
กข49	4			.290	.290	.290	.290			
ชัยนาท 2	4			.297	.297	.297	.297			
สุพรรณบุรี 90	4			.299	.299	.299	.299			
พัทลุง	4				.305	.305	.305	.305		
กข1	4				.308	.308	.308	.308		
กข23	4					.329	.329	.329		
กข15	4						.363	.363	.363	
กข7	4							.377	.377	.377
กข43	4								.428	.428
กข41	4									.447
Sig.		.055	.071	.060	.062	.062	.056	.065	.078	.060

ตารางผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไทอะมีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์

		Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กข41	Between Groups	.005	3	.002	13.372	.000
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	.006	15			
กข43	Between Groups	.001	3	.000	3.518	.049
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	.002	15			
สุพรรณบุรี 1	Between Groups	.007	3	.002	22.845	.000
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	.009	15			
กข29	Between Groups	.004	3	.001	3.228	.061
	Within Groups	.005	12	.000		
	Total	.008	15			
กข11	Between Groups	.000	3	.000	2.417	.117
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	.001	15			
พิษณุโลก 2	Between Groups	.004	3	.001	23.404	.000
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	.005	15			

ตารางผนวกที่ 8 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของไทอะมีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว 3 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT

ระยะ	N	Subset for alpha = 0.05					
		กข41		สุพรรณบุรี 1		พิษณุโลก 2	
		1	2	1	2	1	2
ระยะดอกบาน	4	.027		.035		.040	
ระยะน้ำนม	4		.066		.076		.075
ระยะข้าวเม่า	4		.066		.084		.077
ระยะเก็บเกี่ยว	4		.070		.089		.082
Sig.		1.000	.592	1.000	.102	1.000	.286

ตารางผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์

Dependent Variable: ปริมาณโปรตีน					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.570[a]	23	.025	43.669	.000
Intercept	2.842	1	2.842	5005.295	.000
Cultivar	.111	5	.022	39.194	.000
stage	.416	3	.139	244.413	.000
Cultivar x stage	.023	15	.002	2.693	.003
Error	.037	65	.001		
Total	3.597	89			
Corrected Total	.607	88			
a. R Squared = .939 (Adjusted R Squared = .918)					

ตารางผนวกที่ 10 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีนในเมล็ดข้าว 6 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT

Cultivar	N	Subset			
		1	2	3	4
กข11	12	.13158			
พิษณุโลก 2	13	.13492			
กข29	16		.16919		
สุพรรณบุรี 1	16			.20481	
กข41	16			.20869	
กข43	16				.22856
Sig.		.706	1.000	.662	1.000

ตารางผนวกที่ 11 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของไทอะมีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าวด้วยวิธี DMRT

ระยะการพัฒนาของเมล็ด	N	Subset			
		1	2	3	4
ระยะดอกบาน	22	.09445			
ระยะเก็บเกี่ยว	23		.13722		
ระยะข้าวเม่า	22			.23955	
ระยะน้ำนม	22				.26405
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อมิลลิกรัมโปรตีนในข้าว 6 พันธุ์ที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.635[a]	23	.071	26.664	.000
Intercept	5.795	1	5.795	2173.808	.000
cultivar	1.153	5	.231	86.470	.000
stage	.415	3	.138	51.895	.000
cultivar * stage	.071	15	.005	1.778	.057
Error	.173	65	.003		
Total	7.189	89			
Corrected Total	1.808	88			

ตารางผนวกที่ 13 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อมิลลิกรัมโปรตีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดด้วยวิธี DMRT

ระยะการพัฒนาของเมล็ด	N	Subset			
		1	2	3	4
ระยะดอกบาน	22	.14186			
ระยะน้ำนม	22		.23641		
ระยะเก็บเกี่ยว	23			.28061	
ระยะข้าวเม่า	22				.32305
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางผนวกที่ 14 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อมิลลิกรัมโปรตีนในเมล็ดข้าว 6 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT

พันธุ์	N	Subset				
		1	2	3	4	5
สุพรรณบุรี 1	16	.13206				
กข41	16	.15750	.15750			
กข43	16		.19144			
กข29	16			.23269		
กข11	12				.37167	
พิษณุโลก 2	13					.46185
Sig.		.187	.080	1.000	1.000	1.000

ตารางผนวกที่ 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อเมล็ดในข้าว 6 พันธุ์ที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.005[a]	23	.000	78.228	.000
Intercept	.014	1	.014	5003.558	.000
cultivar	.001	5	.000	95.479	.000
stage	.004	3	.001	421.232	.000
cultivar * stage	.000	15	2.747E-005	9.694	.000
Error	.000	65	2.833E-006		
Total	.019	89			
Corrected Total	.005	88			

ตารางผนวกที่ 16 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อเมล็ดในข้าว 6 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT

cultivar	N	Subset				
		1	2	3	4	5
สุพรรณบุรี 1	16	.00781				
กข41	16		.00912			
กข29	16			.01106		
กข43	16			.01219		
พิษณุโลก 2	13				.01677	
กข11	12					.01900
Sig.		1.000	1.000	.075	1.000	1.000

ตารางผนวกที่ 17 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TPP ต่อเมล็ดในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดด้วยวิธี DMRT

stage	N	Subset			
		1	2	3	4
ระยะดอกบาน	22	.00341			
ระยะเก็บเกี่ยว	23		.00996		
ระยะน้ำนม	22			.01605	
ระยะข้าวเม่า	22				.01964
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ประวัตินักวิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ

สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย บูรพา
	169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131
โทรศัพท์	038-103-127
โทรสาร	038-393-489
อีเมลล์	phakpoompp@yahoo.com

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

นางเกศราภรณ์ จันทร์ประเสริฐ

สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย บูรพา
	169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131
โทรศัพท์	038-103-090
โทรสาร	038-393-489
อีเมลล์	Janprasert10@hotmail.com

ความผันแปรของปริมาณไทอามีนในข้าวไทย

Variability of Thiamine Concentration in Thai rice

มณฑนี โพธิ์แสง, เกศราภรณ์ จันทร์ประเสริฐ และ ภาคภูมิ พระประเสริฐ*

Monthani Phosaeng, Ketsaraporn Junprasert and Phakpoom Phraprasert*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Biology Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 22 May 2018

Accepted : 6 July 2018

Published online : 1 August 2018

บทคัดย่อ

การศึกษาความผันแปรของปริมาณไทอามีนในพันธุ์ข้าวไทยและศึกษาปริมาณไทอามีนในระยะการพัฒนาต่าง ๆ ของเมล็ดข้าว พบว่าปริมาณไทอามีนรวม (ไทอามีน ไทอามีนโมโนฟอสเฟสและไทอามีนไพโรฟอสเฟส) ในข้าวไทยทั้ง 30 พันธุ์ มีความผันแปรอยู่ระหว่าง 0.144-0.447 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างกันมากถึง 0.303 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม แสดงให้เห็นว่าการสร้างและสะสมไทอามีนขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของข้าวแต่ละพันธุ์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณไทอามีนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้เมล็ดข้าวที่พัฒนาในระยะต่าง ๆ มีปริมาณไทอามีนที่สะสมในเมล็ดแตกต่างกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าระยะดอกบานมีปริมาณไทอามีนน้อยที่สุด จากนั้นมีการสร้างและสะสมไทอามีนเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนมและคงที่ในระยะข้าวเม่าถึงระยะเก็บเกี่ยวซึ่งเป็นระยะที่พบปริมาณไทอามีนมากที่สุด โดยพบว่าข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีอัตราการสร้างไทอามีนเพิ่มขึ้นมากที่สุดโดยเพิ่มขึ้นถึง 0.054 ไมโครกรัมต่อเมล็ดจากระยะดอกบานถึงระยะเก็บเกี่ยว ดังนั้นปริมาณไทอามีนที่สะสมในเมล็ดจึงขึ้นอยู่กับอัตราการสร้างและสะสมไธอามีนระหว่างพัฒนาการของเมล็ด

คำสำคัญ : ไทอามีน, วิตามินบี 1, การพัฒนาของเมล็ด, ข้าว

***Corresponding author. E-mail:** phakpoompp@yahoo.com

Abstract

The study of variation in thiamine content in Thai rice and the changes of thiamin-levels in developing grains were evaluated. The variation of total thiamine contents (free thiamine, thiamine monophosphate and thiamine pyrophosphate) in 30 cultivars of rice were between 0.144-0.447 mg/100 g. The variability of total thiamine among these cultivars was 0.303 mg/100g. This demonstrated that thiamine biosynthesis and accumulation were depended on genetic traits of each cultivar thus this showed the possibility to improve thiamine contents via breeding programme. In addition, the thiamine contents of rice grains at different stages of grain development were significantly difference which at flowering stage had the lowest of thiamine and then thiamine tended to clearly increase at milky stage and constant at dough stage and maturity stage demonstrated the highest of thiamine. Suphan Buri 1 was the highest synthesized and accumulated of thiamine from flowering stage to maturity stage (0.054 μg/seed). Therefor, the thiamine contents in grains were depended on rate of biosynthesis and accumulation during grain development.

Keywords: thiamine, vitamin B1, grain development, rice

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชที่มีความสำคัญต่อมนุษย์ เป็นอาหารหลักของคนไทยและอีก 50 เปอร์เซ็นต์ของประชากรโลก นอกจากบทบาทในด้านอาหารแล้วข้าวถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับประเทศ ในปี 2015 ถึง 2018 ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกข้าวเป็นอันดับที่สองรองจากประเทศอินเดีย (USDA, 2018) นอกจากข้าวเป็นแหล่งสำคัญของคาร์โบไฮเดรตที่ให้พลังงานแล้วยังมีสารโภชนาการกลุ่มอื่นด้วย เช่น วิตามิน แร่ธาตุ โปรตีน และไขมัน เป็นต้น (Cho & Lim, 2016) ซึ่งสารอาหารและวิตามินส่วนใหญ่จะพบได้มากในเยื่อหุ้มเมล็ดและจมูกข้าว มีรายงานทางโภชนาการจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าข้าวกล้องมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าข้าวขาวที่ขัดเอาส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดและจมูกข้าวออกจนหมด (Juliano, 2016; Kyritsi *et al*., 2011; Lebiedziǹska & Szefer, 2006; Li *et al*., 2007) ซึ่งในปัจจุบันมีการส่งเสริมให้ประชาชนบริโภคข้าวกล้องมากขึ้นเพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ

ข้าวกล้องเป็นแหล่งที่ดีของไทอามีน (thiamine) หรือวิตามินบี 1 ซึ่งเป็นวิตามินที่พบได้มากในธัญพืช อยู่ในกลุ่มวิตามินที่ละลายน้ำ ไทอามีนเป็นสารตั้งต้นของโคเอนไซม์ไทอามีนไพโรฟอสเฟส (Thiamine pyrophosphate) ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างพลังงานให้กับร่างกาย (Champe *et al*., 2008) ส่งเสริมการทำงานของเนื้อเยื่อและระบบประสาท เนื่องจากมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ในการสังเคราะห์ไทอามีน ไทอามีนจึงเป็นวิตามินที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ที่ต้องได้รับจากอาหาร 95-98 % ของไทอามีนในร่างกายมนุษย์ คือ อนุพันธุ์ของไทอามีน ได้แก่ ไทอามีนโมโนฟอสเฟต ไทอามีนไพโรฟอสเฟตและไทอามีนไตรฟอสเฟต (Eijkman & Grijns, 2012) ร่างกายจะดูดซึมไทอามีนที่ตัดเอาหมู่ฟอสเฟตออกจากการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเตสที่ลำไส้เล็กและส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย พบมากที่บริเวณหัวใจ ตับ ไต และสมอง (Sriram *et al*., 2012) ปัจจุบันพบว่าประชากรที่มีการบริโภคข้าวที่ผ่านการขัดสีเป็นหลักมักเกิดอาการขาดไทอามีน (Goyer, 2010) เนื่องจาก

ไทอามีนถูกสะสมอยู่มากบริเวณชั้นรำ (bran layer) ในผู้ใหญ่ควรได้รับไทอามีน 1.0-1.5 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งจะถูกสะสมในร่างกายเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ไทอามีนยังสลายไปกับการล้างและให้ความร้อนทำให้พบอาการขาดไทอามีนได้บ่อยครั้ง ซึ่งจะส่งผลต่อระบบประสาทและกล้ามเนื้อทั่วร่างกาย ทำให้เกิดอาการเหน็บชา กล้ามเนื้อไม่มีแรงและอาจส่งผลรุนแรงถึงเสียชีวิตได้ ซึ่งการเพิ่มคุณภาพของข้าวโดยการเพิ่มปริมาณไทอามีนเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

จากการศึกษาปริมาณไทอามีนรวม (ไทอามีน ไทอามีนโมโนฟอสเฟสและไทอามีนไพโรฟอสเฟส) และไทอามีนในธัญพืชที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงความผันแปรของปริมาณไทอามีนรวมและไทอามีนอย่างชัดเจน มีรายงานการศึกษาปริมาณไทอามีนในข้าวสาลี 49 พันธุ์ พบว่าพันธุ์ที่ต่างกันทำให้ปริมาณไทอามีนรวมมีความผันแปรอยู่ในช่วง 0.26-0.61 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Batifoulier *et al*., 2006) ปริมาณไทอามีนรวมในข้าวทริทิเคลี 7 พันธุ์มีความผันแปรประมาณ 0.02 มิลลิกรัม/100 กรัม (Witten & Aulrich, 2018) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าในธัญพืชพันธุ์ต่าง ๆ มีการสร้างและสะสมไทอามีนรวมในปริมาณที่ต่างกัน นอกจากความผันแปรที่เกิดจากพันธุ์ที่แตกต่างกันแล้วเมล็ดในแต่ละระยะการพัฒนาส่งผลต่อปริมาณของไทอามีนในเมล็ดด้วย Buchholz *et al*. (2012) พบว่าไทอามีนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นขณะที่เมล็ดพัฒนาระยะต่าง ๆ ในธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวทริทิเคลี ข้าวไรน์ ข้าวโอ๊ตและข้าวบาร์เลย์ โดยมีอัตราการสร้างมากที่สุดในช่วงแรกของการพัฒนาจากนั้นจะคงที่ถึงระยะเก็บเกี่ยว ซึ่งการศึกษาปริมาณไทอามีนรวมและไทอามีนในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ และในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าวเป็นสิ่งที่น่าสนใจเนื่องจากอาจเป็นข้อมูลที่นำไปสู่ความสามารถในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณไทอามีนเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งยังไม่พบข้อมูลปริมาณไทอามีนในข้าวระยะต่าง ๆ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาปริมาณไทอามีนในพันธุ์ข้าวไทย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ข้าวพันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพทางด้านโภชนาการต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

พันธุ์ข้าวและวิธีการปลูก

เมล็ดข้าว 30 พันธุ์ ได้แก่ กข1 กข3 กข7 กข9 กข11 กข15 กข23 กข29 กข31 กข41 กข43 กข49 สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 2 สุพรรณบุรี 3 สุพรรณบุรี 60 สุพรรณบุรี 90 ชัยนาท 1 ชัยนาท 2 ปทุมธานี 1 ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวเจ้าหอมสุพรรณ ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 1 เหลืองปะทิว พิษณุโลก 2 (ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) ล้นยุ้ง เหลืองอ่อน ขาวตาหวิน พัทลุง และหอมแดง (เก็บจากพื้นที่จังหวัดจันทบุรี) นำเมล็ดเพาะบนกระดาษเพาะเมล็ดที่มีความชื้นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นย้ายต้นกล้าข้าวลงปลูกในกระถางพลาสติก 1 ต้นต่อ 1 กระถางที่บรรจุดิน 1000 กรัม และปุ๋ยออสโมโคส (Osmocote) สูตร 13-13-13 จำนวน 10 กรัม โดยปลูกพันธุ์ละ 4 ต้น นำกระถางแช่ลงในอ่างซีเมนต์รักษาให้น้ำอยู่ที่ระดับผิวดิน ดูแลรักษาจนกระทั่งถึงระยะเก็บเกี่ยว ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

การหาปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง

การหาปริมาณไทอามีนรวมจากเมล็ดข้าว 30 พันธุ์ ทำด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Liu *et al*. (2002) โดยนำตัวอย่างเมล็ดข้าวต้นละ 5 เมล็ด บดให้ละเอียด นำไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ใส่ในโกร่ง เติมน้ำกลั่น 750 ไมโครลิตร บดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 25 นาที นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 30 ไมโครลิตร มาเติม NH_4Cl-$NH_3{\cdot}H_2O$ buffer pH 7.7 ปริมาตร 240 ไมโครลิตร 1% polyvinyl alcohol ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ 0.05% bromothymol blue ปริมาตร 240 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น

ปริมาตร 1410 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร หาปริมาณไทอามีนรวมในตัวอย่างโดยนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (thiamine hydrochloride, Sigma)

การหาปริมาณไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

คัดเลือกข้าวที่มีปริมาณไทอามีนรวมมาก ปานกลาง และต่ำอย่างละ 2 พันธุ์ มาทำการปลูกตามวิธีการข้างต้น จากนั้นเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าว 4 ระยะ คือ ระยะดอกบาน (flowering stage) ระยะข้าวน้ำนม (milky stage) ระยะข้าวเม่า (dough stage) และระยะเก็บเกี่ยว (maturity stage) เพื่อศึกษาปริมาณไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด โดยสกัดไทอามีน จากเมล็ดข้าวทั้ง 4 ระยะที่ประกอบด้วย lemma และ palea จำนวนต้นละ 20 เมล็ด ด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วสกัดด้วยน้ำ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร โดยใช้โกร่งบดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 25 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้กรองผ่าน membrane filtered ขนาด 0.45 ไมครอน หาปริมาณไทอามีนด้วยเทคนิค HPLC ดัดแปลงจากวิธีของ Moongngarm and Saetung (2010) ใช้คอลัมน์ C-18 (Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18, 4.6x150 mm, 4 um Agilent) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลซียส ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ 50 mM phosphate buffer pH 5.6 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 v/v เป็น mobile phase กำหนดอัตราการไหลที่ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 233 nm นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (thiamine hydrochloride, Sigma)

แผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (complete randomized design, CRD) โดยแต่ละทรีทเมนต์ทำการทดลอง 4 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี One-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การหาปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง 30 พันธุ์

จากการนำเมล็ดข้าวกล้องในระยะเก็บเกี่ยวจำนวน 30 พันธุ์ มาสกัดและศึกษาปริมาณไทอามีนรวมด้วยวิธีการทางสเปกโตโฟโตเมตรี แสดงให้เห็นว่าข้าวกล้องทั้ง 30 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งเมล็ดข้าวกล้อง 5 พันธุ์มีปริมาณของไทอามีนรวมมากที่สุด คือกข41 กข43 กข7 กข15 และกข23 รองลงมาได้แก่พันธุ์กข1 พัทลุง สุพรรณบุรี 90 ชัยนาท 2 กข49 ปทุมธานี 1 สุพรรณบุรี 3 สุพรรณบุรี 60 ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี ขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี 1 กข29 กข3 สุพรรณบุรี 2 ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 1 ล้นยุ้ง เหลืองอ่อน ขาวตาหวิน หอมแดง กข9 เหลืองประทิว ชัยนาท 1 และข้าวกล้อง 3 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนรวมน้อยที่สุด คือ กข31 กข11 และพิษณุโลก 2 (ภาพที่ 1) โดยข้าวกล้องทั้ง 30 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนรวมอยู่ในช่วง 0.144-0.447 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งมีไทอามีนรวมเฉลี่ยเท่ากับ 0.274 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จากรายงานของ Rujirapisit *et al.* (2012) ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของข้าวไทย 9 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวหอมอุบล ข้าวสินเหล็ก ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวเล้าแตกและข้าวหอมกัญญา พบความผันแปรของไทอามีนรวมอยู่ในช่วง 0.16-0.32 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และ Prasad *et al.* (2018) ศึกษาในข้าวอินเดีย

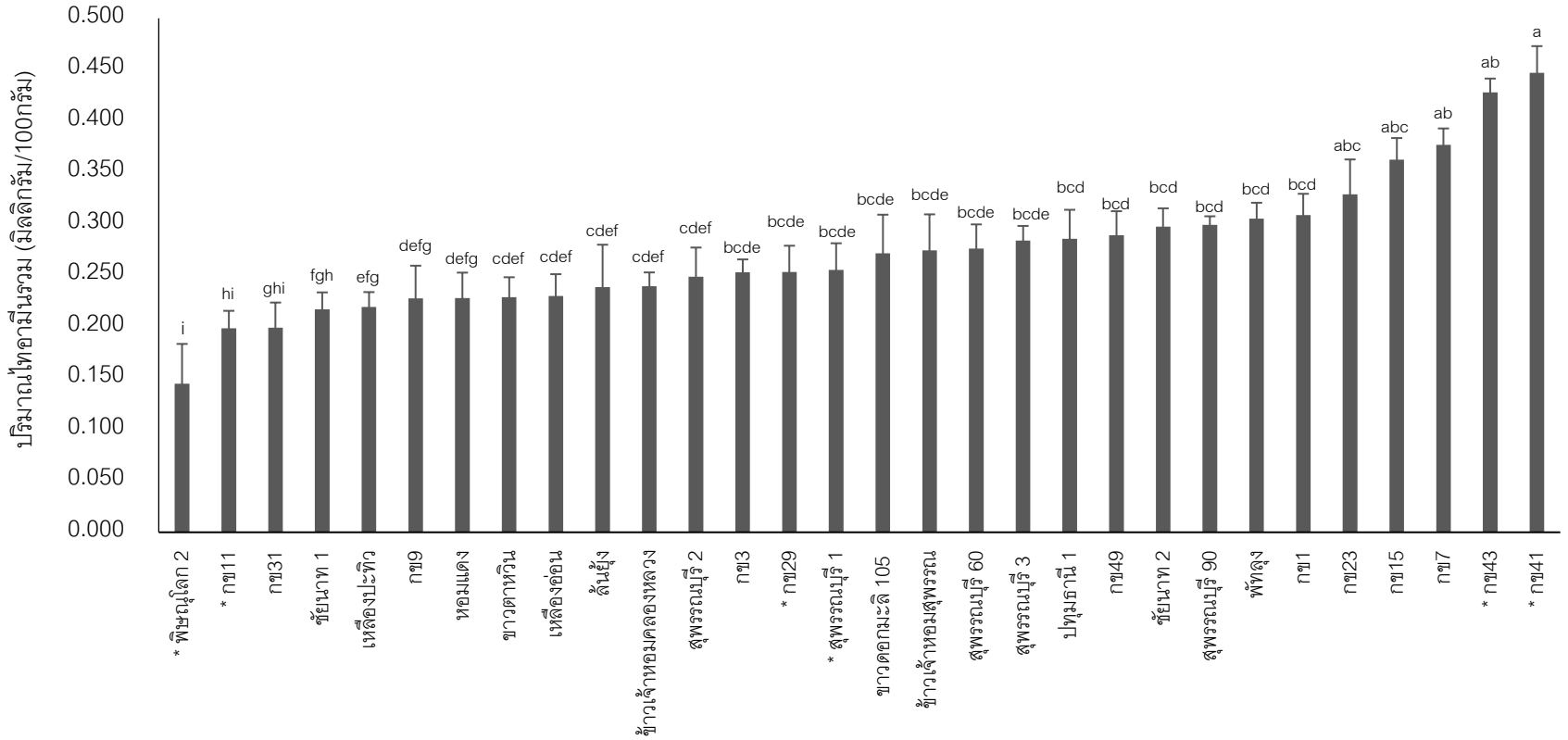
11 พันธุ์ พบความผันแปรของไทอามีนรวมในช่วง 0.12-0.19 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งจากการศึกษาปริมาณไทอามีนรวมในข้าวไทยทั้ง 30 พันธุ์ พบว่ามีความผันแปรอยู่ระหว่าง 0.144-0.447 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างกันมากถึง 0.303 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งจากความผันแปรของปริมาณไทอามีนที่พบในข้าว 30 พันธุ์ที่ได้ทำการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการสร้างและสะสมไทอามีนขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของแต่ละพันธุ์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการผสมระหว่างพันธุ์ที่มีลักษณะที่ดีกับพันธุ์ที่มีปริมาณไทอามีนมากเพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้มีการสร้างและสะสมไทอามีนเพิ่มขึ้น เช่น ถ้าใช้แหล่งพันธุกรรมจากข้าวพันธุ์ กข 41 มาปรับปรุงการสร้างและการสะสมไทอามีนของข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 อาจสามารถทำให้ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 มีปริมาณไทอามีนสูงขึ้นได้ถึง 3 เท่า นอกจากแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มปริมาณไทอามีนแล้ว ความแตกต่างของปริมาณไทอามีนในข้าวแต่ละพันธุ์ยังแสดงให้เห็นว่า หากต้องการบริโภคข้าวกล้องเพื่อให้ได้รับไทอามีนในปริมาณที่ควรได้รับต่อวันคือ 1-1.5 มิลลิกรัม ต้องบริโภคข้าวกล้องพันธุ์พิษณุโลก 2 ถึง 1000 กรัม ขณะที่พันธุ์กข41 บริโภคเพียง 300 กรัมเพื่อให้ได้ปริมาณไทอามีนที่เท่ากันขณะที่ปริมาณแป้งที่ได้รับต่างกันอย่างมาก ดังนั้นหากสามารถเพิ่มไทอามีนในข้าวให้มีปริมาณที่มากขึ้น ไม่เพียงแต่นำไปสู่การพัฒนาพันธุ์ข้าวไทยที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่โดดเด่นยังเป็นอีกหนึ่งทางเลือกให้กับผู้บริโภคที่ใส่ใจในสุขภาพและผู้ป่วยที่ต้องการควบคุมการบริโภคแป้งให้น้อยลงได้ อย่างไรก็ตามความผันแปรของไทอามีนสามารถเกิดได้หลายปัจจัย ได้แก่ ชนิด ความผันแปรทางพันธุกรรม พันธุ์ สภาพแวดล้อมในการปลูก (Witten & Aulrich, 2018) และความเครียดจากปัจจัยต่าง ๆ Rapala-Kozik *et al.* (2008) รายงานว่าความเครียดจากความเค็ม การขาดน้ำและจากออกซิเดชั่นทำให้ไทอามีนมีการสร้างมากขึ้นในข้าวโพด ดังนั้นการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ อาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณไทอามีนในข้าวให้สูงขึ้นได้

จากการศึกษาปริมาณไทอามีนรวมสามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์ข้าวด้วยวิธีทางสถิติและสามารถเลือกพันธุ์ที่มีปริมาณไทอามีนรวมในกลุ่มสูง ปานกลางและต่ำอย่างละ 2 พันธุ์ คือพันธุ์ กข41 (0.447 mg/100g) กข43 (0.428 mg/100g) สุพรรณบุรี 1 (0.255 mg/100g) กข29 (0.253 mg/100g) กข11 (0.198 mg/100g) และพิษณุโลก 2 (0.144 mg/100g) ตามลำดับ

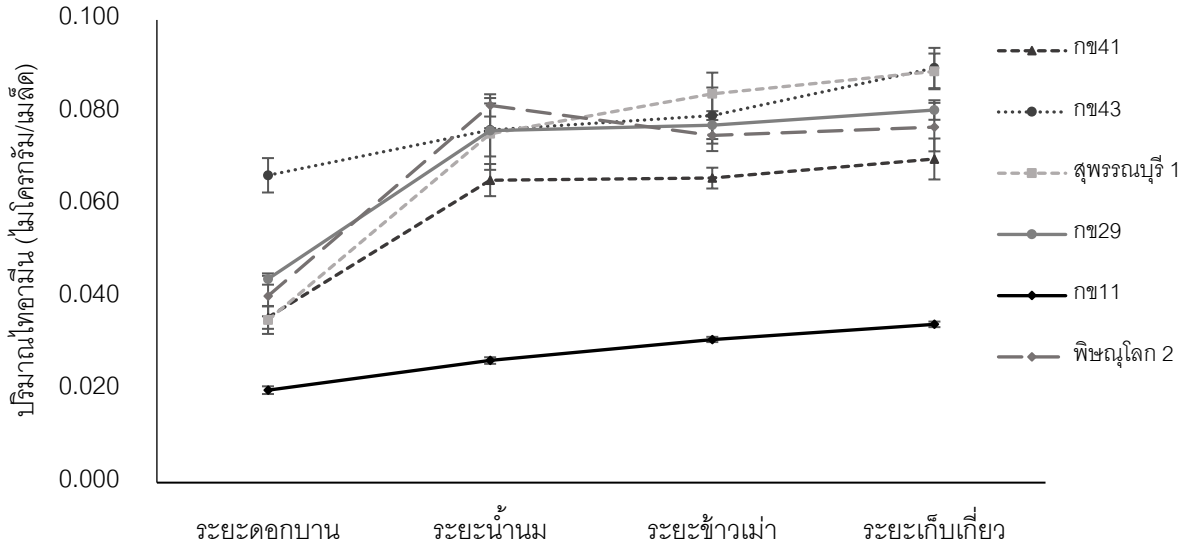
การหาปริมาณไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

การศึกษาปริมาณไทอามีนในเมล็ดข้าวทั้งสี่ระยะ ได้แก่ ระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยว พบว่าเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาและสะสมแป้งมากขึ้นการสะสมไทอามีนในเมล็ดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าระยะดอกบานมีปริมาณไทอามีนน้อยที่สุด และหลังจากนั้นจึงมีการสร้างและสะสมปริมาณไทอามีนเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนม จากนั้นจะค่อนข้างคงที่จนถึงระยะเก็บเกี่ยวซึ่งเป็นระยะที่พบปริมาณของไทอามีนมากที่สุดในข้าว 5 พันธุ์คือ กข41 กข43 สุพรรณบุรี 1 กข29 และกข11 ขณะที่พันธุ์พิษณุโลก 2 มีปริมาณไทอามีนสูงที่สุดในระยะน้ำนม จากนั้นลดลงในระยะข้าวเม่าและคงที่จนกระทั่งถึงระยะเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 2) สอดคล้องกับรายงานของ Shimizu *et al.* (1990) ที่พบว่าการสร้างของไทอามีนในเมล็ดข้าวพันธุ์ Nihonbare ที่ช่วงการพัฒนาหลังจากดอกบาน พบว่าปริมาณไทอามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วประมาณ 50 นาโนกรัม/เมล็ดตั้งแต่ 10 วันหลังจากดอกบานจนถึง 30 วันหลังดอกบานจากนั้นจะเริ่มคงที่จนกระทั่งถึง 50 วันหลังจากดอกบาน ทั้งนี้มีรายงานว่ากระบวนการสังเคราะห์ไทอามีนเกิดขึ้นในพลาสติดเนื่องจากพบการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ไทอามีน (Roje, 2007) จึงทำให้พบการสะสมของไทอามีน

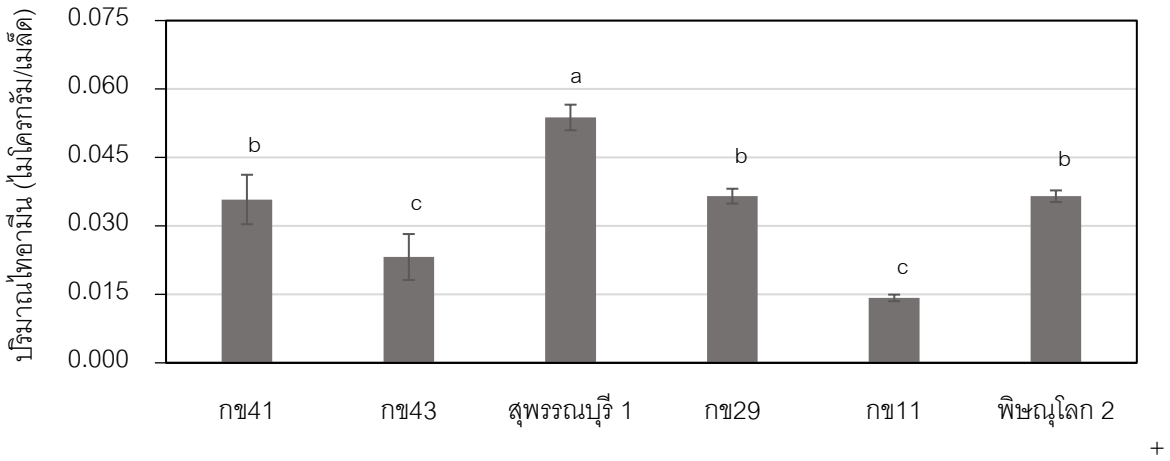
มากในช่วงที่เมล็ดเป็นสีเขียว (Phraprasert, 2015) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Buchholz *et al.* (2012) พบว่าไทอามีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาในช่วงต้นและเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในช่วงปลายของการพัฒนาของเมล็ด ขณะที่ปริมาณไทอามีนโมโนฟอสเฟสและไทอามีนไพโรฟอสเฟสซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของไทอามีนมีแนวโน้มลดลงและการศึกษาในเมล็ดงาโดย Watanabe *et al.* (2003) พบว่าปริมาณไทอามีนเพิ่มขึ้นเมื่อเมล็ดงาเริ่มมีการพัฒนาและสูงที่สุดในระยะที่เมล็ดแก่เต็มที่ ซึ่งเมล็ดจะสะสมไทอามีนมากที่สุดเมื่อพัฒนาเต็มที่จนเข้าสู่ระยะพักตัว โดยไทอามีนจับอยู่กับ thiamin-binding protein เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการงอกของเมล็ด (Ampo *et al*., 2007) เมื่อเกิดการดูดน้ำของเมล็ดไทอามีนจะถูกเปลี่ยนเป็นไทอามีนไพโรฟอสเฟตมีบทบาทสำคัญในวิถีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต การสังเคราะห์พลังงานเคมีในรูป NADH, NADPH และ ATP เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรมรวมถึงการสร้างสารตัวกลางในวิถีไกลโคไลซีส (Rapala-Kozik, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าระยะดอกบานมีปริมาณไทอามีนแตกต่างจากระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในข้าวพันธุ์กข41 สุพรรณบุรี 1 และพิษณุโลก 2 ขณะที่พันธุ์กข43 กข29 และกข11 ทั้ง 4 ระยะมีปริมาณไทอามีนไม่แตกต่างกันและในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าวทั้ง 6 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนแตกต่างกันที่นัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยในระยะดอกบานของข้าวทั้ง 6 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนอยู่ในช่วง 0.020-0.066 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ระยะน้ำนมมีไทอามีนอยู่ในช่วง 0.026-0.082 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยวมีไทอามีนอยู่ในช่วง 0.031-0.084 และ 0.034-0.090 ไมโครกรัมต่อเมล็ดตามลำดับ (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าปริมาณไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดมีความผันแปรค่อนข้างสูงในข้าวพันธุ์ต่างกัน นอกจากนี้พบว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีอัตราการสร้างไทอามีนในเมล็ดไม่เท่ากันส่งผลให้ปริมาณไทอามีนในระยะเก็บเกี่ยวของข้าวทั้ง 6 พันธุ์แตกต่างกัน โดยหากพิจารณาจากปริมาณไทอามีนในระยะเก็บเกี่ยวจะเห็นได้ว่าข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีปริมาณไทอามีนสูงถึง 0.089 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ขณะที่ในระยะดอกบานมีปริมาณไทอามีนเพียง 0.035 ไมโครกรัมต่อเมล็ด แสดงให้เห็นว่าปริมาณไทอามีนในระยะเก็บเกี่ยวไม่ได้มีผลมาจากปริมาณไทอามีนตั้งต้นในระยะดอกบานแต่อาจเกิดจากอัตราการสร้างไทอามีนของข้าวแต่ละพันธุ์มีไม่เท่ากัน ซึ่งพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีอัตราการสร้างไทอามีนเพิ่มขึ้นมากที่สุดโดยเพิ่มขึ้นถึง 0.054 ไมโครกรัมต่อเมล็ด รองลงมาได้แก่พันธุ์กข29 พิษณุโลก 2 กข41 กข43 และกข11 มีการสร้างไทอามีนเพิ่มขึ้นเพียง 0.037, 0.037, 0.036, 0.023 และ 0.014 ไมโครกรัมต่อเมล็ดตามลำดับ (ภาพที่ 3) ซึ่ง Watanabe *et al.* (2004) รายงานว่าเมล็ดข้าวสาลีที่กำลังพัฒนา 0-6 สัปดาห์หลังจากดอกบานมีไทอามีนเพิ่มขึ้นประมาณ 0.028 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ดังนั้นอัตราการสร้างไทอามีนของข้าวแต่ละพันธุ์เป็นเรื่องที่ควรศึกษาต่อไป เนื่องจากเป็นไปได้ว่าข้าวพันธุ์ที่มีอัตราการสังเคราะห์ไทอามีนสูงเป็นเพราะความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์ไทอามีน เช่น 4-methyl-5-β-hydroxyethylthiazole phosphate synthase และ 4-amino-2-methyl-5-hydroxymethylpyrimidine monophosphate kinase (Phraprasert, 2015) สามารถทำงานได้มากกว่าพันธุ์ที่มีอัตราการสร้างที่ต่ำกว่า จากข้อมูลดังกล่าวอาจนำไปสู่ความก้าวหน้าในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณไทอามีนในเมล็ดเพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับข้าวไทยต่อไป



ภาพที่ 1 ปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง 30 พันธุ์ (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT); *, พันธุ์ข้าวที่มีปริมาณไทอามีนรวมในกลุ่มสูง ปานกลางและต่ำ และนำไปใช้เพื่อศึกษาในการทดลองที่ 2)



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไทอามีนระหว่างการพัฒนาของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์ (▲) กข41 (●) กข43 (■) สุพรรณบุรี 1 (●) กข29 (◆) กข11 และ (◆) พิษณุโลก 2 (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE)



ภาพที่ 3 ปริมาณไทอามีนที่เพิ่มขึ้นจากระยะดอกบานถึงระยะเก็บเกี่ยว (ไมโครกรัม/เมล็ด) (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE) ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาความผันแปรของไทอามีนรวมในข้าวไทยทั้ง 30 พันธุ์พบว่ามีความผันแปรอยู่ระหว่าง 0.144-0.447 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งต่างกันมากถึง 0.303 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม นอกจากนี้ระยะการพัฒนาของเมล็ดที่ต่างกันส่งผลให้การสร้างไทอามีนและปริมาณไทอามีนที่สะสมในเมล็ดแตกต่างกันด้วย พบว่าระยะดอกบานมีปริมาณไทอามีนน้อยที่สุด จากนั้นมีการสร้างและสะสมไทอามีนเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนมและคงที่ในระยะข้าวเม่าถึงระยะเก็บเกี่ยวซึ่งเป็นระยะที่พบปริมาณไทอามีนสะสมมากที่สุด ซึ่งความผันแปรนี้อาจนำไปสู่การพัฒนาพันธุ์ข้าวไทยให้มีปริมาณไทอามีนสูงขึ้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 83/2558

เอกสารอ้างอิง

Ampo, M., Asada, E., Takebayashi, M., Shibata, K., Mitsunaga, T., & Watanabe, K. (2007). Biosynthesis of thiamin-binding proteins in developing sesame seeds. *Plant Biotechnology, 24*, 331–334.

Batifoulier, F., Verny, M. A., Chanliaud, E., Remesy, C., & Demigne, C. (2006). Variability of B vitamin concentrations in wheat grain, milling fractions and bread products. *European Journal of Agronomy, 25*(2), 163-169.

Buchholz, M., Drotleff, A. M., & Ternes, W. (2012). Thiamin (vitamin B1) and thiamin phosphate esters in five cereal grains during maturation. *Journal of Cereal Science, 56*, 109-114.

Champe, P. C., Harvey, R. A., & Ferrier, D. R. (2008). *Biochemistry* (4 ed.). U.S.A: Lippincott Williams and Wilkins.

Cho, D. H., & Lim, S. T. (2016). Germinated brown rice and its bio-functional compounds. *Food Chemistry, 196*, 259-271.

Eijkman, C., & Grijns, C. (2012). Thiamin. In G. F. Combs (Ed.), *The Vitamins* (4th ed., pp. 261-275). USA: Academic Press.

Goyer, A. (2010). Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry, 71*(14-15), 1615-1624.

Juliano, B. O. (2016). Rice: Overview. In C. Wrigley, H. Corke, Seetharaman, K., & J. Faubion (Eds.), *Encyclopedia of Food Grains* (Vol. 1, pp. 125-129): Oxford: Academic Press.

Kyritsi, A., Tzia, C., & Karathanos, V. T. (2011). Vitamin fortified rice grain using spraying and soaking methods. *LWT - Food Science and Technology, 44*(1), 312-320.

Lebiedzińska, A., & Szefer, P. (2006). Vitamins B in grain and cereal–grain food, soy-products and seeds. *Food Chemistry, 95*(1), 116-122.

Li, X., Huang, K., He, X., Zhu, B., Liang, Z., Li, H., & Luo, Y. (2007). Comparison of nutritional quality between Chinese indica rice with sck and crylAc genes and its nontransgenic counterpart. *Journal of Food Science, 72*(6), S420-S424.

Liu, S., Zhang, Z., Liu, Q., Luo, H., & Zheng, W. (2002). Spectrophotometric determination of vitamin B1 in a pharmaceutical formulation using triphenylmethane acid dyes. *J Pharm Biomed Anal, 30*(3), 685-694.

Moongngarm, A., & Saetung, N. (2010). Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated. *Food Chemistry, 122*, 782-788. (in Thai)

Phraprasert, P. (2015). The Role of Thiamine (Vitamin B1) in Plants. *Burapha Science Journal, 20*(2), 221-231. (in Thai)

Prasad, V. S. S., Hymavathi, A., Babu, V. R., & Longvah, T. (2018). Nutritional composition in relation to glycemic potential of popular Indian rice varieties. *Food Chemistry, 238*, 29-34.

Rapala-Kozik, M. (2011). Vitamin B-1 (Thiamine): A Cofactor for Enzymes Involved in the Main Metabolic Pathways and an Environmental Stress Protectant. *Biosynthesis of Vitamins in Plants: Vitamins a, B1, B2, B3, B5, Pt A, 58*, 37-91.

Rapala-Kozik, M., Kowalska, E., & Ostrowska, K. (2008). Modulation of thiamine metabolism in Zea mays seedlings under conditions of abiotic stress. *J Exp Bot, 59*(15), 4133-4143.

Roje, S. (2007). Vitamin B biosynthesis in plants. *Phytochemistry, 68*(14), 1904-1921.

Rujirapisit, P., Sangkaeo, W., & Leowsakulrat, S. (2012). Nutritional Value of 9 Rice Cultivars. *Agricultural Science Journal, 43*(2), 173-176. (in Thai)

Shimizu, M., Mitsunaga, T., Inaba, K., Yoshida, T., & Iwashima, A. (1990). Accumulation of Thiamine and Thiamine-binding Protein during Development of Rice Seed. *Plant Physiology, 137*, 123-124.

Sriram, K., Manzanares, W., & Joseph, K. (2012). Thiamine in nutrition therapy. *Nutr Clin Pract, 27*(1), 41-50.

United States Department of Agriculture. (2018). *Grain: world markets and trade*. Retrieved from https://www.fas.usda.gov/data/grain-world-markets-and-trade. (30 June 2018).

Watanabe, K., Nishida, N., Adachi, T., Ueda, M., Mitsunaga, T., & Kawamura, Y. (2004). Accumulation and degradation of thiamin-binding protein and level of thiamin in wheat seeds during seed maturation and germination. *Biosci Biotechnol Biochem, 68*(6), 1243-1248.

Watanabe, K., Takahashi, H., Ampo, A., & Mitsunaga, T. (2003). Change of thiamin-binding protein and thiamin levels during seed maturation and germination in sesame. *plant physiol Biochemistry, 41*, 973-976.

Witten, S., & Aulrich, K. (2018). Effect of variety and environment on the amount of thiamine and riboflavin in cereals and grain legumes. *Animal Feed Science and Technology, 238*, 39-46.