ปริมาณและกิจกรรมการสังเคราะห์ไทอามีนในข้าวไทย

มณฑนี โพธิ์แสง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ธันวาคม 2561

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ มณฑนี โพธิ์แสง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฏฐา เสนีวาส)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ)

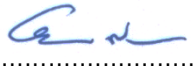
.....กรรมการ

(ดร.วาสินี พงษ์ประยูร)

.....กรรมการ

(ดร.นิตยา ไชยเนตร)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพของมหาวิทยาลัยบูรพา



.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่...19...เดือน.....ธันวาคม.....พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์หลาย ๆ ท่าน โดยเฉพาะผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาที่คอยให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา เสียสละเวลาแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เป็นแรงผลักดันในการทำวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จลุล่วงจึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณผศ.ดร.ณัฏฐา เสนีวาส ประธานคณะกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ ดร.วาสินี พงษ์ประยูร และดร.นิตยา ไชยเนตร ซึ่งเป็นคณะกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและปรับปรุงแก้ไขในข้อบกพร่องต่าง ๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ อาจารย์ ดร. ณมนรัก คำฉัตร และอาจารย์อรรถกร คำฉัตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณีที่เอื้อเฟื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่ทำการวิจัยในงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณครู อาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ เจ้าของงานวิจัยที่ใช้อ้างอิงตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยให้คำแนะนำต่าง ๆ และให้การสนับสนุนตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้แทนกตเวทิตาแด่บุพการี คณาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน

มณฑนี โพธิ์แสง

57912221: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)
คำสำคัญ: ข้าว/ ไทอามีน/ การสังเคราะห์ไทอามีน/ เอนไซม์ HMPK/TMP-PPase

มณฑนี โพธิ์แสง: ปริมาณและกิจกรรมการสังเคราะห์ไทอามีนในข้าวไทย (THE CONTENTS AND BIOSYNTHESIS OF THIAMINE IN THAI RICE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ภาคภูมิ พระประเสริฐ, Ph.D. 76 หน้า. ปี พ.ศ. 2561.

ข้าวกล้องเป็นแหล่งของวิตามินบี 1 หรือไทอามีนที่ดีแหล่งหนึ่ง ดังนั้นจึงทำการศึกษาปริมาณไทอามีนรวมในข้าว 30 พันธุ์ เพื่อศึกษาความผันแปรของปริมาณไทอามีนในข้าว พบว่าไทอามีนรวมในพันธุ์ข้าวไทย 30 พันธุ์มีปริมาณแตกต่างกัน ซึ่งมีความผันแปรสูงถึง 0.303 mg/ 100 g โดยพันธุ์พิษณุโลก 2 มีไทอามีนรวมต่ำที่สุดและพันธุ์กข41 มีปริมาณไทอามีนรวมสูงที่สุด คือ 0.144 และ 0.447 mg/ 100 g ตามลำดับ เมื่อคัดเลือกข้าว 6 พันธุ์ที่มีปริมาณไทอามีนรวมสูง ปานกลางและต่ำอย่างละ 2 พันธุ์จากทั้งหมด 30 พันธุ์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพของเมล็ดกับปริมาณไทอามีนรวม พบว่าปริมาตรชั้นรำและความหนาชั้นรำมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณไทอามีนรวม (r = 0.50 และ 0.68 ตามลำดับ) ซึ่งบริเวณชั้นรำเป็นส่วนที่พบการสะสมของไทอามีนสูงที่สุด รองลงมาคือส่วนของเอ็มบริโอและเอนโดสเปิร์ม คิดเป็นร้อยละ 70-82, 14-20 และ 8-15 ของไทอามีนในเมล็ดข้าวกล้องตามลำดับ จากการทดสอบทางสถิติพบว่าเอ็มบริโอทั้ง 6 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนไม่แตกต่างกัน ชี้ให้เห็นว่าปริมาณไทอามีนที่ต่างกันของข้าวกล้องขึ้นกับความผันแปรของไทอามีนบริเวณชั้นรำเป็นหลัก นอกจากนี้ในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดมีการสะสมไทอามีนและกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase (HMP kinase/ thiamine-phosphate pyrophos phorylase) ที่สังเคราะห์ไทอามีนแตกต่างกัน ในระยะดอกบานมีปริมาณไทอามีนและกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase น้อยที่สุด (0.04 ug/grain และ 0.14 nmol thiamine/mg protein/min ตามลำดับ) จากนั้นมีการสร้างและสะสมไทอามีนเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนมและเริ่มคงที่ในระยะข้าวเม่าถึงระยะเก็บเกี่ยวซึ่งเป็นระยะที่ปริมาณไทอามีนมากที่สุดขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ลดลง (0.07 ug/grain และ 0.03 nmol thiamine/mg protein/min ตามลำดับ) จากข้อมูลดังกล่าวเห็นถึงความผันแปรของไทอามีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่สังเคราะห์ไทอามีน ซึ่งเป็นผลทั้งจากพันธุกรรมของข้าวและระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าวที่ต่างกัน แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีการสะสมไทอามีนในเมล็ดสูงขึ้นได้

57912221: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCE; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCE)
KEYWORDS: RICE/ THIAMINE/ THIAMINE BIOSYNTHESIS/ HMPK/TMP-PPase

MONTHANI PHOSAENG: THE CONTENTS AND BIOSYNTHESIS OF THIAMINE IN THAI RICE. ADVISORY COMMITTEE: PHAKPOOM PHRAPRASERT, Ph.D. 76 P. 2018.

Brown rice is a recommended source of thiamine (vitamin B1). Therefore, the total thiamine content was determined in 30 Thai rice cultivars to access the variation of thiamine contents. It was found that the 30 rice cultivars were significantly different in total thiamine content and the high variability of total thiamine was 0.303 mg/100g. Phitsanulok 2 rice had the lowest and RD41 rice had the highest of total thiamine which were 0.144 and 0.447 mg/100g, respectively. Six rice cultivars were selected from 30 cultivars based on their differences in the content of total thiamine including two rice cultivars from each level of high, medium and low content to analyze the correlation between physical characteristic of grain and total thiamine content. It was found that volume and width of bran layer were positively correlated with total thiamine (r = 0.50 and 0.68 respectively). The highest accumulation of thiamine was in bran layer following by embryo and endosperm (70-82%, 14-20% and 8-15% of thiamine in brown rice respectively). The statistical analysis showed that thiamine content were not different in embryo of 6 rice cultivars. Thus, the major variation of thiamine content in brown rice depends on the variation of thiamine content in bran layer. In addition, at different stages of grain development showed the different accumulation of thiamine and HMPK/TMP-PPase activity. At flowering stage had the lowest of thiamine and HMPK/TMP-PPase activity (0.04 ug/grain and 0.14 nmol thiamine/mg protein/min respectively). Thiamine clearly increase at milky stage and constant at dough stage to maturity stage. Finally at maturity stage had the highest of thiamine but HMPK/TMP-PPase activity tended to decrease (0.07 ug/grain and 0.03 nmol thiamine/mg protein/min respectively). These results showed the variation of thiamine content and activity of enzyme which involve thiamine biosynthesis depends on the difference of genetic variation and grain developmental phase. It shows the possibility to develop high-thiamine rice.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ที่มาและความสำคัญ..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

สมมติฐานของการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

ข้าวและความสำคัญ..... 5

ระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว (ripening phase)..... 5

ไทอามีน (Thiamine) และความสำคัญ..... 6

การสังเคราะห์ไทอามีน..... 6

บทบาทของไทอามีน..... 10

ปริมาณไทอามีนในเมล็ดธัญพืช..... 12

การสังเคราะห์ไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดธัญพืช..... 13

การศึกษาโครงสร้างของเมล็ดข้าว..... 16

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 18

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี..... 18

พันธุ์ข้าวและวิธีการปลูก..... 20

การศึกษาปริมาณไทอามีนรวมในข้าวกล้องด้วยวิธีการทางสเปกโตโฟโตเมตรี..... 20

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	การศึกษาความหนาของชั้นรำ ปริมาตรชั้นรำ ปริมาตรของเมล็ดข้าวกล้อง ปริมาตรเอนโดสเปิร์มและความหนาแน่นของเอนโดสเปิร์ม	21
	การศึกษาปริมาณไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้องและในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด	23
	การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีนในเมล็ดข้าวที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด	24
4	ผลการทดลอง	26
	ปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธีการทางสเปกโตโฟโตเมตรี	26
	ความหนาของชั้นรำ ปริมาตรของเมล็ดข้าวกล้อง ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรชั้นรำและความหนาแน่นของเอนโดสเปิร์ม	28
	ปริมาณไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้อง	37
	ปริมาณไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด	38
	กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีนในเมล็ดข้าวที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด	40
5	อธิปรายและสรุปผล	45
	อภิปรายผลการทดลอง	45
	สรุปผลการทดลอง	51
	ข้อเสนอแนะ	51
บรรณานุกรม		52
ภาคผนวก		59
	ภาคผนวก ก	60
	ภาคผนวก ข	62
ประวัติย่อของผู้วิจัย		76

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4-1 ความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด ความหนาชั้นรำ และปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง 6 พันธุ์..... 28

4-2 ปริมาตรเมล็ดข้าวกล้อง ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรชั้นรำ และปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง 6 พันธุ์..... 31

4-3 สัดส่วนระหว่างปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรชั้นรำ ปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาตรชั้นรำ และปริมาตรชั้นรำต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวกล้องและปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง 6 พันธุ์..... 34

4-4 ความหนาแน่นเอนโดสเปิร์มและการเปรียบเทียบปริมาตรเอนโดสเปิร์มและน้ำหนักของเอนโดสเปิร์มจากวิธีแทนที่น้ำและตัดตามขวาง..... 36

4-5 ปริมาณไทอามีนในเอนโดสเปิร์ม เอ็มบริโอและชั้นรำของข้าวกล้อง..... 37

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 การพัฒนาของเมล็ดข้าวตั้งแต่ระยะดอกบานถึงระยะเก็บเกี่ยว..... 6

2-2 โครงสร้างของไทอามีนและอนุพันธ์..... 7

2-3 กระบวนการสังเคราะห์ไทอามีนและอนุพันธ์..... 11

2-4 บทบาทของไทอามีนไดฟอสเฟตในวิถีเมตาบอลิซึม..... 12

2-5 การเปลี่ยนแปลงของไทอามีนและอนุพันธ์ในเมล็ดงาขณะเมล็ดพัฒนา..... 14

2-6 การเปลี่ยนแปลงของไทอามีนและอนุพันธ์ระหว่างการพัฒนาของเมล็ดข้าวสาลี ข้าวทริทิเคลี ข้าวไรน์ ข้าวโอ๊ตและข้าวบาร์เลย์..... 15

2-7 การเปลี่ยนแปลงของไทอามีนระหว่างการพัฒนาของเมล็ดหลังจากดอกบานในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.)..... 15

2-8 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนที่จับกับไทอามีนและการจับของไทอามีนกับโปรตีนของเมล็ดงาระหว่างการพัฒนาหลังจากดอกบาน..... 16

2-9 โครงสร้างของเมล็ดข้าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง..... 17

3-1 ตัวอย่างการวัดความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด และความหนาชั้นรำ..... 22

4-1 ปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง 30 พันธุ์..... 27

4-2 ภาพตัดตามขวางของเมล็ดข้าวกล้อง 6 พันธุ์ที่ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง..... 29

4-3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรเมล็ด ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรชั้นรำ ความหนาชั้นรำ สัดส่วนปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรชั้นรำ ปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาตรชั้นรำ และปริมาตรชั้นรำต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาณไทอามีนรวม..... 32

4-4 ปริมาณไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้องต่อหนึ่งเมล็ด..... 38

4-5 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไทอามีนระหว่างการพัฒนาของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์..... 39

4-6 การตรวจสอบเบื้องต้นของสารละลายไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟตที่ผ่านคอลัมน์ภายใต้แสง..... 40

4-7 ^{1}H-NMR ของไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต..... 41

4-8 ^{31}P-NMR ของไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต..... 41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-9 ^{31}P-NMR ของกรดฟอสฟอริก..... 42

4-10 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในแต่ละระยะการพัฒนาของข้าว 6 พันธุ์..... 43

4-11 กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase เฉลี่ยในข้าว 6 พันธุ์ที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด..... 44

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ข้าว *(Oryza sativa)* เป็นอาหารหลักของคนไทยและอีก 50 เปอร์เซ็นต์ของประชากรโลก (Babu, Subhasree, Bhakyaraj, & Vidhyalakshmi, 2009) เนื่องจากข้าวประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่ให้พลังงาน นอกจากบทบาททางด้านอาหารแล้ว ข้าวยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับประเทศ ปัจจุบันผลผลิตข้าวในแถบภูมิภาคเอเชียหลายประเทศปรับเพิ่มขึ้น ในปี 2015 ถึง 2018 ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกข้าวเป็นอันดับที่สองรองจากประเทศอินเดียทำให้ส่วนแบ่งทางการตลาดและมูลค่าของข้าวไทยได้รับผลกระทบ (USDA, 2018) การเร่งสร้างเอกลักษณ์ที่ดีจะเป็นการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันทางการตลาดและมูลค่าให้กับข้าวไทย ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับคุณค่าทางอาหารของข้าวเป็นเรื่องจำเป็นเพื่อใช้ในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ปัจจุบันประชากรใส่ใจในการบริโภคอาหารเพื่อส่งเสริมสุขภาพมากขึ้น เน้นที่การคำนึงถึงคุณประโยชน์และคุณค่าต่อร่างกายจากอาหารที่รับประทานเข้าไปเป็นหลัก สังเกตได้จากปริมาณการปลูกผักปลอดสารพิษที่เพิ่มขึ้น ลดการบริโภคอาหารที่ผ่านการปรุงแต่งหรือผ่านกรรมวิธีที่ทำให้คุณค่าทางอาหารลดลง ซึ่งข้าวกล้องเป็นหนึ่งในอาหารเพื่อสุขภาพที่ได้รับความนิยม เนื่องจากข้าวกล้องยังมีส่วนของชั้นรำ (bran) และเอ็มบริโอหรือจมูกข้าว (germ) ที่เป็นแหล่งของไฟเบอร์ โปรตีน ไขมัน แร่ธาตุและวิตามิน (Cho & Lim, 2016) ข้าวกล้องเป็นแหล่งที่ดีของไทอามีน (thiamine) หรือวิตามินบี1 ซึ่งเป็นวิตามินที่พบได้มากในธัญพืช จัดอยู่ในกลุ่มวิตามินที่ละลายน้ำ มีบทบาทสำคัญในการสร้างพลังงานให้กับร่างกายส่งเสริมการทำงานของเนื้อเยื่อและระบบประสาท ในมนุษย์จำเป็นต้องได้รับไทอามีนจากอาหาร เช่น ธัญพืช ถั่ว ไข่ไก่และเนื้อสัตว์ เนื่องจากมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ไทอามีนได้เอง ในร่างกายมนุษย์ 95-98 % ของไทอามีน คืออนุพันธ์ของไทอามีน ได้แก่ ไทอามีนโมโนฟอสเฟต ไทอามีนไดฟอสเฟตและไทอามีนไตรฟอสเฟต (Eijkman & Grijns, 2012) ร่างกายจะดูดซึมไทอามีนที่ตัดเอาหมู่ฟอสเฟตออกจากการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเตสที่ลำไส้เล็กและส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย พบมากที่บริเวณหัวใจ ตับ ไตและสมอง (Sriram, Manzanares, & Joseph, 2012) หากร่างกายได้รับไทอามีนในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการทำงานของร่างกายจะส่งผลต่อระบบประสาททำให้เกิดอาการเหน็บชา กล้ามเนื้อไม่มีแรงและอาจส่งผลรุนแรงถึงเสียชีวิตได้ (Brody, 1999) กลุ่มประชากรที่มีรายได้ต่ำมักจะพบ

อาการขาดไทอามีนมาก เนื่องจากต้องการพลังงานเพื่อใช้ในการทำงานมาก อีกทั้งโอกาสในการเข้าถึงอาหารที่มีราคาแพง เช่น เนื้อสัตว์และไข่ไก่เป็นไปได้ยาก ข้าวกล้องจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นแหล่งของไทอามีน ซึ่งการเพิ่มคุณภาพของข้าวโดยการเพิ่มปริมาณของไทอามีนเป็นสิ่งที่น่าสนใจ อาจใช้เป็นทางเลือกในการป้องกันหรือใช้สำหรับการบำบัดโรคของผู้ป่วยที่ต้องการรักษาตนเองด้วยวิธีธรรมชาติ (นิลวรรณ เพชระบูรนิล, จตุรพร พรศิลปทิพย์, รพีพรรณ เกตุศิระ และปรีดา ยังสุขสถาพร, 2548)

จากการศึกษาปริมาณไทอามีนรวม (ไทอามีน ไทอามีนโมโนฟอสเฟสและไทอามีนไดฟอสเฟส) และไทอามีนในธัญพืชที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงความผันแปรของปริมาณไทอามีนรวมและไทอามีนอย่างชัดเจน ซึ่งความผันแปรต่าง ๆ เป็นผลมาจากชนิดของธัญพืช โดยพบว่าข้าวกล้องมีปริมาณไทอามีนรวมประมาณ 0.3 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Lebiedziǹska & Szefer, 2006) ขณะที่ในข้าวสาลีมีปริมาณไทอามีนรวมประมาณ 0.4 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม นอกจากนี้ความผันแปรของไทอามีนอาจเกิดจากสายพันธุ์ที่ต่างกันด้วย มีรายงานการศึกษาปริมาณไทอามีนรวมในข้าวสาลี 49 พันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่ต่างกันทำให้ปริมาณไทอามีนรวมมีความผันแปรอยู่ในช่วง 0.26-0.61 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Batifoulier, Verny, Chanliaud, Remesy, & Demigne, 2006) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ อาจมีการสร้างและสะสมไทอามีนรวมในปริมาณที่ต่างกัน เป็นไปได้ว่าปริมาณไทอามีนในเมล็ดข้าวอาจสามารถทำให้เพิ่มสูงขึ้นได้ ไม่เพียงแต่ความผันแปรที่เกิดจากชนิดและสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน เมล็ดในแต่ละระยะการพัฒนาส่งผลต่อปริมาณของไทอามีนในเมล็ดด้วย Buchholz, Drotleff, and Ternes (2012) พบว่าไทอามีนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นขณะที่เมล็ดพัฒนาระยะต่าง ๆ ในธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวทริทิเคลี ข้าวไรน์ ข้าวโอ๊ตและข้าวบาร์เลย์ โดยมีอัตราการสร้างมากที่สุดในช่วงแรกของการพัฒนาจากนั้นจะคงที่ถึงระยะเก็บเกี่ยว ซึ่งอัตราการสร้างไทอามีนที่ต่างกันในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดอาจเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละระยะทำงานได้แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างไทอามีน Goyer (2010) รายงานว่าเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีนไคเนส/เอนไซม์ไทอามีนฟอสเฟตไพโรฟอสโฟรีเลส (HMP kinase/thiamine-phosphate pyrophosphorylase, HMPK/TMP-PPase) มีบทบาทสำคัญในการเติมฟอสเฟตให้วงแหวนไพริมิดีนและเร่งการรวมตัวกันของวงแหวนไพริมิดีนและวงแหวนไทแอโซลได้เป็นโครงสร้างของไทอามีนโมโนฟอสเฟตก่อนเปลี่ยนรูปเป็นไทอามีน ถ้าพืชขาดเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase จะทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ไทอามีนได้ ดังนั้นการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด อาจเป็นประโยชน์สำหรับการ

ปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณไทอามีนในเมล็ดได้

การศึกษาปริมาณไทอามีนรวมและไทอามีนในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าวยังมีการศึกษาไม่มากนัก การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาปริมาณไทอามีนรวมและปริมาณไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดในข้าวไทยและศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ข้าวพันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพทางด้านโภชนาการ ซึ่งการพัฒนาพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีปริมาณไทอามีนเพิ่มสูงขึ้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาแหล่งพันธุ์ที่ดี เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยให้มีปริมาณไทอามีนเพิ่มมากขึ้นต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณไทอามีนรวมในข้าวกล้องไทยพันธุ์ต่าง ๆ
2. เพื่อศึกษาปริมาณไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด
3. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

1. พันธุ์ข้าวที่ต่างกันจะมีปริมาณของไทอามีนที่สะสมในเมล็ดต่างกัน
2. ระยะการพัฒนาของเมล็ดที่ต่างกันมีปริมาณไทอามีนต่างกัน
3. ระยะการพัฒนาของเมล็ดที่ต่างกันมีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีนต่างกันในข้าวต่างพันธุ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านคุณค่าทางอาหารของข้าวไทยเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อเพิ่มเอกลักษณ์และมูลค่าให้กับข้าวไทย นอกจากนี้ยังเป็นทางเลือกในการบริโภคเพื่อส่งเสริมสุขภาพให้กับประชาชน

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาปริมาณไทอามีนรวมในข้าวกล้องจำนวน 30 พันธุ์ ในระยะที่เมล็ดมีการเจริญเต็มที่

2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพของเมล็ดกับปริมาณไทอามีนรวมของข้าว 6 พันธุ์

3. ศึกษาปริมาณไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์

4. ศึกษาปริมาณไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดของข้าว 6 พันธุ์

5. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีนในระยะการพัฒนาของเมล็ดที่ต่างกัน ได้แก่ ระยะเริ่มออกดอก ระยะข้าวน้ำนม ระยะข้าวเม่า และระยะเก็บเกี่ยว

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

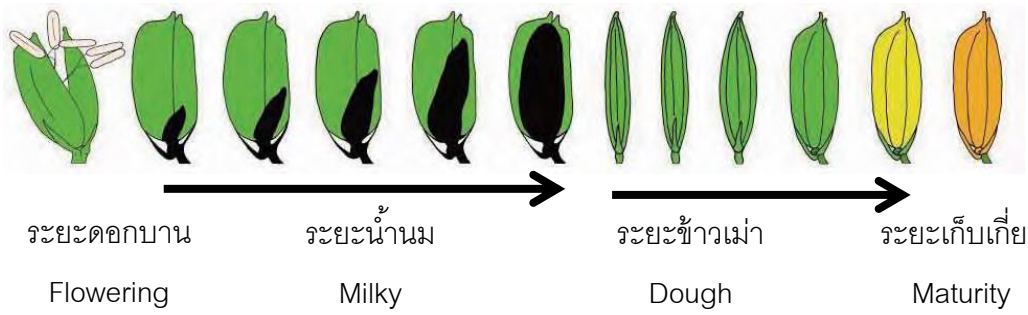
2.1 ข้าวและความสำคัญ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชล้มลุกจัดอยู่ในวงศ์ Poaceae สามารถเจริญได้ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น เมล็ดข้าว ประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ แกลบ (husk) และเนื้อผลหรือข้าวกล้อง (brown rice) ที่ประกอบด้วย เอ็มบริโอ (จมูกข้าว) รำและเอนโดสเปิร์ม (แป้ง) ร้อยละ 2, 6 และ 92 ตามลำดับ ข้าวเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญต่อมนุษย์เป็นอาหารหลักของคนไทยและอีกร้อยละ 50 ของประชากรโลก เป็นแหล่งสำคัญของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ นอกจากนี้ข้าวยังประกอบด้วยสารอาหารที่สำคัญหมู่อื่น ๆ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ และวิตามิน (บุญหงษ์ จงคิด, 2547) ข้าวเป็นแหล่งที่ดีของไทอามีน ไรโบฟลาวินและไนอาซิน ซึ่งสารอาหารและวิตามินส่วนใหญ่จะพบได้มากในเยื่อหุ้มชั้นนอกและเอ็มบริโอของธัญพืช (Buchholz et al., 2012) จึงเป็นสาเหตุให้ข้าวขัดขาวที่ขัดเอาส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดและเอ็มบริโอออกจนหมดมีวิตามินเหลือเพียงเล็กน้อย จากรายงานของ Liu, Zheng, and Chen (2017) พบว่าการสีข้าวทำให้สูญเสียไทอามีนถึง 80-90% เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวกล้อง

2.2 ระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว (ripening phase)

ช่วงการพัฒนาของเมล็ดข้าวเริ่มขึ้นหลังจากการผสมเกสรขณะที่ดอกข้าวบาน (flowering) โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 30 วัน ในช่วงนี้เมล็ดจะมีขนาดและน้ำหนักมากขึ้น เนื่องจากการสะสมแป้งที่ได้จากการสังเคราะห์แสงของใบธง สีของเมล็ดจะเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลทองในระยะเก็บเกี่ยวเต็มที่ (ภาพที่ 2-1) ส่วนของใบและลำต้นจะเป็นสีเหลือง ระยะการพัฒนาของเมล็ด สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ คือ ระยะน้ำนม (milky stage) ซึ่งจะเกิดขึ้นหลังการออกดอกประมาณ 7-12 วัน ในระยะนี้ภายในเมล็ดเริ่มมีการสะสมแป้ง ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม เมื่อผ่านระยะน้ำนมไปแล้ว จะเข้าสู่ระยะข้าวเม่า (dough stage) ในช่วงเวลาประมาณ 13-24 วันหลังการออกดอก เมล็ดมีการสะสมแป้งมากขึ้น น้ำในแป้งของเมล็ดจะค่อย ๆ ระเหยไป เมล็ดจะเริ่มแข็ง สีของเมล็ดจะเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวจนกระทั่งกลายเป็นสีเหลือง จากนั้นเมล็ดจะพัฒนาเข้าสู่ระยะเก็บเกี่ยว (maturity stage) ใช้เวลาประมาณ 25-35 วันหลังข้าวออกดอก เมล็ดในระยะนี้จะมีลักษณะแข็งใส สีน้ำตาลทองพร้อมต่อการเก็บเกี่ยว (Moldenhauer, Wilson, Counce, & Hardke, 2001; บุญหงษ์ จงคิด, 2547)

ทั้งนี้อายุการเก็บเกี่ยวของข้าวขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและสภาพแวดล้อมที่ทำการปลูก รวมถึงพันธุ์ข้าวที่ต่างกันอาจทำให้ระยะเวลาในการพัฒนาของเมล็ดมีความแตกต่างกัน



ภาพที่ 2-1 การพัฒนาของเมล็ดข้าวตั้งแต่ระยะดอกบานถึงระยะเก็บเกี่ยว
(ดัดแปลงจาก Moldenhauer et al., 2001)

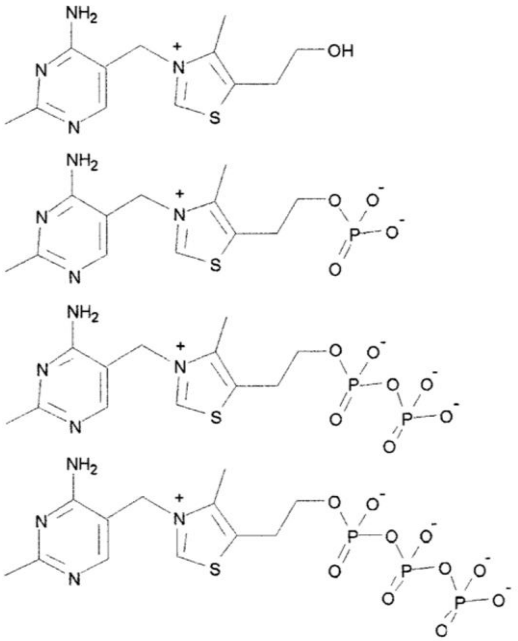
2.3 ไทอามีน (Thiamine) และความสำคัญ

ไทอามีน หรือ วิตามินบี 1 จัดอยู่ในกลุ่มวิตามินที่ละลายน้ำ เป็นวิตามินที่จำเป็นต่อมนุษย์ เนื่องจากร่างกายของมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินชนิดนี้ได้ จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร ไทอามีนมีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ไทอามีนเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์โคเอนไซม์ไทอามีนไดฟอสเฟต (thiamine diphosphate) (หรือไทอามีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate)) โดยอาศัย ATP (Champe, Harvey, & Ferrier, 2008) 95-98 % ของไทอามีนในร่างกายมนุษย์ คืออนุพันธ์ของไทอามีน (Eijkman & Grijns, 2012) ร่างกายจะดูดซึมไทอามีนที่ตัดเอาหมู่ฟอสเฟตออกจากการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเตสที่ลำไส้เล็กและส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย พบมากที่บริเวณหัวใจ ตับ ไต และสมอง (Sriram et al., 2012) ในผู้ใหญ่ควรได้รับไทอามีนประมาณ 1.2 มิลลิกรัมต่อวัน ปัจจุบันพบว่าประชากรที่มีการบริโภคข้าวที่ผ่านการสีเป็นหลักมักจะเกิดอาการขาดไทอามีน (Goyer, 2010) นอกจากนี้ไทอามีนยังสลายไปกับการล้างและให้ความร้อนด้วย การขาดไทอามีนมีผลต่อระบบประสาทและกล้ามเนื้อทั่วร่างกาย ทำให้เกิดอาการเหน็บชากล้ามเนื้อไม่มีแรงและอาจส่งผลรุนแรงถึงเสียชีวิตได้ (จุรีรัตน์ ดาดวง, 2555)

2.4 การสังเคราะห์ไทอามีน

โครงสร้างของไทอามีน ประกอบด้วยวงแหวนไทแอโซลและวงแหวนไพริมีดีนเชื่อมต่อกันด้วยหมู่เมทิลีน (methylene bridge) อนุพันธ์ของไทอามีน คือ ไทอามีนโมโนฟอสเฟต ไทอามีน

ไดฟอสเฟตและไทอามีนไตรฟอสเฟต (ภาพที่ 2-2) การสังเคราะห์ไทอามีนในขั้นต้นจะเกิดการสังเคราะห์แยกกันของวงแหวนทั้งสอง (ภาพที่ 2-3)



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างของไทอามีนและอนุพันธ์ (ที่มา Pinto, Pedersén, Snoeijs, Van Nieuwerburgh, & Colepicolo, 2002)

2.4.1 การสังเคราะห์วงแหวนไทแอโซล

วงแหวนไทแอโซลในพืชสังเคราะห์จากนิโคตินาไมด์แอดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโนไกลซีนและซิสทีน (Chatterjee, Jurgenson, Schroeder, Ealick, & Begley, 2007) ซึ่งในยีสต์สามารถสังเคราะห์จาก 2-pentulose-5-phosphate กรดอะมิโนไกลซีนหรือไทโรซีนและซิสทีน (Hohmann & Meacock, 1998) ได้เป็นโครงสร้างของไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต (4-methyl-5-β-hydroxyethylthiazole phosphate; HET-P) โดยเอนไซม์ไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟตซินเทส (HET-P synthase) ที่ถอดรหัสจากยีน *THI1* ในอะราบิดอฟซิส (*Arabidopsis thaliana*) และ *THI4* ในยีสต์ (Goyer, 2010) ข้าวโพด (Rapala-Kozik, Olczak, Ostrowska, Starosta, & Kozik, 2007) และข้าว (Wang et al., 2006) จากการตรวจสอบพบว่า ด้านปลาย N ของ HET-P synthase อยู่บริเวณเมมเบรนของพลาสติดซึ่งพบการแสดงออกของยีน *THI1* มากบริเวณเนื้อเยื่อที่มีสีเขียว (Belanger, Leustek, Chu, & Kriz, 1995) มีรายงานว่าในจุลินทรีย์ HET-P สามารถสังเคราะห์ได้จากไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซล (hydroxyethythiazole, HET) ที่ได้จาก

การย่อยสลายไทอามีนและอนุพันธ์ในไซโทพลาสซึมหรือจากภายนอกเซลล์ด้วยกระบวนการรีไซเคิล (salvage pathway) จากการทำงานของเอนไซม์ไทแอโซลไคเนสที่ถอดรหัสจากยีน *THI6* ในยีสต์ (ภาพที่ 2-3) Yazdani et al. (2013) รายงานว่าคล้ายคลึงกับโปรตีน ThiM ที่ถอดรหัสจากยีน *thiM ใน Escherichia coli*

2.4.2 การสังเคราะห์วงแหวนไพริมีดีน

การสังเคราะห์วงแหวนไพริมิดีนในพืชคล้ายคลึงกับในแบคทีเรีย โดยเกิดกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับสารตั้งต้นคืออะมิโนอิมิดาโซลไรโบนิวคลีโอไทด์ (5-aminoimidazole ribonucleotide; AIR) ได้เป็นไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีนโมโนฟอสเฟต (4-amino-2 methyl-5-hydroxymethylpyrimidine monophosphase; HMP-P) ด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีนไคเนส (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 สามารถเกิดได้จากการเติมหมู่ฟอตเฟสให้กับ HMP ที่ได้จากภายในและภายนอกเซลล์ผ่านกระบวนการรีไซเคิล (salvage pathway) โดยอาศัยโปรตีน THI20 ในยีสต์ซึ่งประกอบด้วย 3 โดเมนคือ HMP kinase, HMP-P kinase, และเอนไซม์ไทอามีนเนส (Onozuka, Konno, Kawasaki, Akaji, & Nosaka, 2008) (ภาพที่ 2-3)

2.4.3 การสังเคราะห์ไทอามีนและอนุพันธ์

เมื่อเกิดการสังเคราะห์แยกกันของวงแหวนไพริมีดีนและวงแหวนไทแอโซลจะเกิดการรวมตัวกันได้เป็นโครงสร้างของไทอามีนโมโนฟอสเฟต (thiamine monophosphate; TMP) จากการทำงานของเอนไซม์ไทอามีนฟอสเฟตไพโรฟอสโฟรีเลส (thiamine-phosphate pyrophosphorylase) การศึกษาในต้นอะราบิดอฟซิส ผักกาดและข้าวโพดทั้งสองกระบวนการเกิดจากการกระตุ้นของโปรตีน TH1 BTH1และ THI3 ตามลำดับ (Goyer, 2010) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยสองโดเมนคล้ายกับแบคทีเรียคือด้านปลาย N ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ HMP (HMP(-P) kinase) และด้านปลาย C ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการรวมกันของวงแหวนทั้งสอง (Rapala-Kozik et al., 2007) (Ajjawi, Tsegaye, & Shintani, 2007) ตรงข้ามกับในยีสต์พบว่าเกิดจากโปรตีน THI6 ถอดรหัสจากยีน *THI6* เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยสองโดเมน คือ ด้านปลาย N ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการรวมวงแหวนและด้านปลาย C เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่

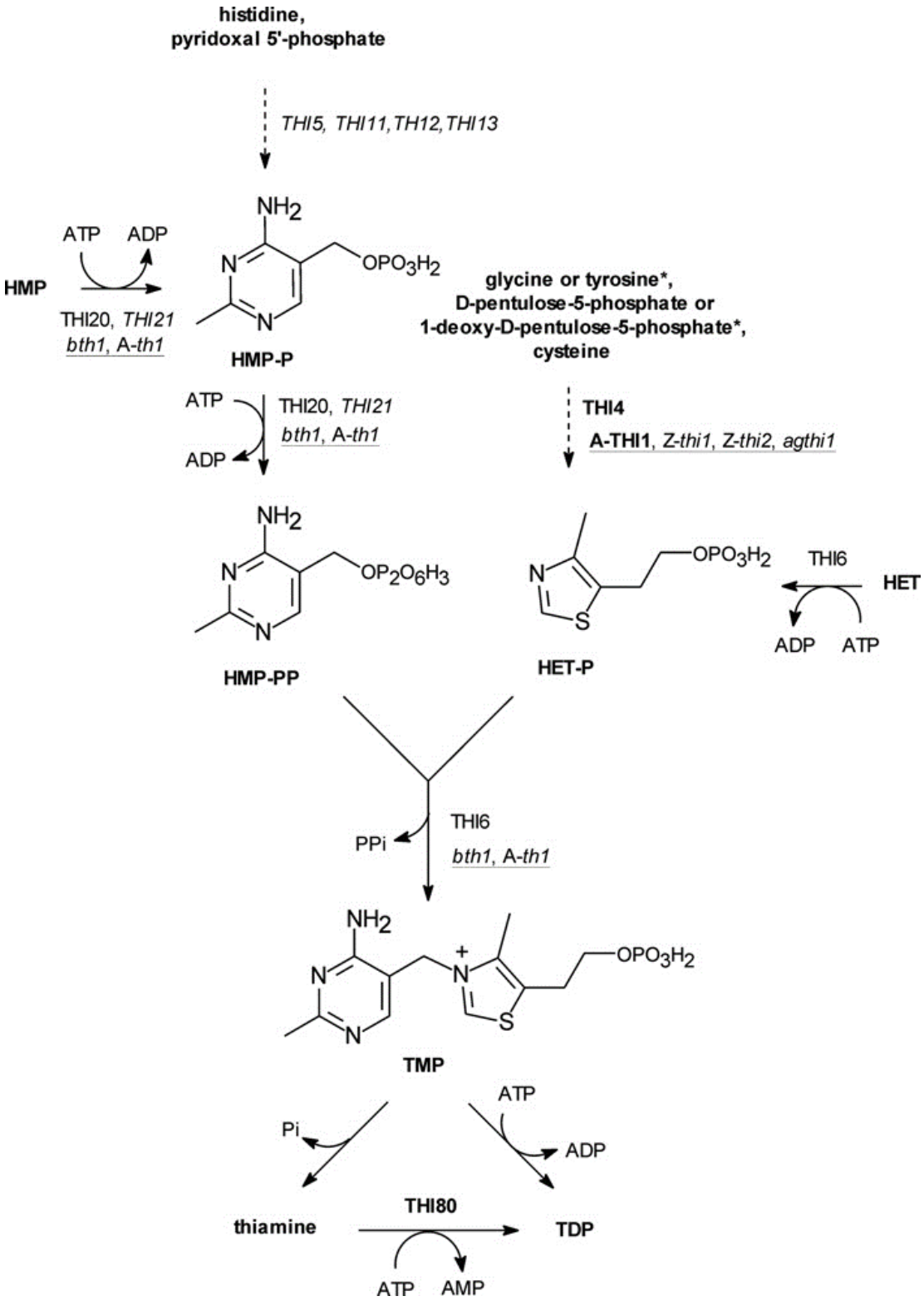
ฟอสเฟตให้กับ HET ในกระบวนการรีไซเคิล (Kim et al., 1998) ต่อมาไทอามีนโมโนฟอสเฟตจะถูกดึงหมู่ฟอสเฟตออกโดยเอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatase) ได้เป็นโครงสร้างของไทอามีนซึ่งกระบวนการทั้งหมดเกิดในคลอโรพลาสต์ (Rapala-Kozik, Wolak, Kujda, & Banas, 2012) จากนั้นไทอามีนจะเปลี่ยนเป็นไทอามีนไดฟอสเฟต โดยเอนไซม์ไทอามีนไพโรฟอสโฟไคเนส (thiamine pyrophosphokinase; TPK) (ภาพที่ 2-3) ที่ได้จากยีน *TPK* ในต้นอะราบิดอฟซิส (Rapala-Kozik, Kowalska, & Ostrowska, 2008) และยีน *THI80* ในยีสต์ (Onozuka et al., 2008) ในไซโตซอล ซึ่งไทอามีนจะถูกส่งออกมาจากคลอโรพลาสต์ผ่านทางโปรตีน (transporter) ที่จำเพาะ จากการศึกษาของ Rapala-Kozik et al. (2012) รายงานว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีน ได้แก่ *THI1, THIC, TH1* และ *TPK* ในต้นกล้าอะราบิดอฟซิสมีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณไทอามีนและอนุพันธ์ เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสภาวะความเครียดทางกายภาพ

2.4.4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีนไคเนส/ไทอามีนฟอสเฟตไพโรฟอสโฟรีเลส (HMPK/TMP-PPase; HMP kinase/ thiamine-phosphate pyrophosphorylase)

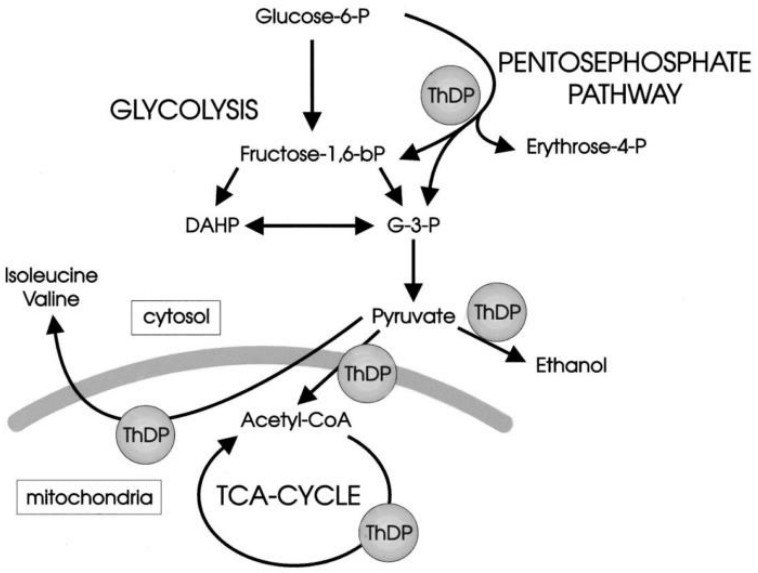
Rapala-Kozik et al. (2007) ศึกษายีน *thi3* ในข้าวโพด โดยนำมาแสดงออกใน *E. coli* และเหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์โปรตีน THI3 ด้วย IPTG (isopropyl-ß-D-thiogalactoside) จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ IMPACT-CNexpression system เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์พบว่าโปรตีน THI3 มีคุณสมบัติของเอนไซม์ TMP-PPase โดยทำให้เกิด TMP จากสารตั้งต้น HMP-PP และ HET-P โดยอาศัย mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ (2.46 nmol TMP/mg protein/min) และพบว่า ATP เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ TMP-PPase ทำให้อัตราการสังเคราะห์ TMP ต่ำลงประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ (0.83 nmol TMP/mg protein/min) อย่างไรก็ตามพบว่าในสภาวะที่มี ATP ในปฏิกิริยาโปรตีน THI3 สามารถสังเคราะห์ TMP ได้จากสารตั้งต้น HMP กับ HET-P แต่อัตราการสร้างต่ำกว่าการสังเคราะห์จากสารตั้งต้น HMP-PP กับ HET-P ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ (0.22 nmol TMP/mg protein/min) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน THI3 ทำหน้าที่เป็นสองเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ไทอามีนคือ เอนไซม์ HMP kinase และเอนไซม์ TMP-PPase ขณะที่ไม่พบการสังเคราะห์ TMP จากปฏิกิริยาที่ใช้ HET เป็นสารตั้งต้น ซึ่งจากการสืบค้นในฐานข้อมูลโปรตีนพบว่าโปรตีน THI3 ในข้าวโพดคล้ายกับพืช 4 ชนิด ได้แก่ ข้าว (*Oryza sativa*) ถั่วแอลแฟลฟา (*Medicago truncatula)* ผักกาด *(Brassica napus*) และอะราบิดอฟซิส *(Arabidopsis thaliana)*

2.5 บทบาทของไทอามีน

ไทอามีนมีบทบาทสำคัญในวิถีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต การสังเคราะห์พลังงานทางเคมีในรูปของ NADH, NADPH และ ATP เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรมรวมถึงการสร้างสารตัวกลางในวิถีไกลโคไลซีส (Rapala-Kozik, 2011) นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในพืชซึ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสง (Tunc-Ozdemir et al., 2009) รูปที่พร้อมทำงานเป็นโคเอนไซม์ของไทอามีนคือไทอามีนไดฟอสเฟต (ThDP) จะทำงานร่วมกับเอนไซม์ในหลาย ๆ ปฏิกิริยา เช่น ปฏิกิริยาการเปลี่ยนไพรูเวต (pyruvate) จากกระบวนการไกลโคไลซิสเป็นแอซิทิลโคเอ (acetyl-CoA) ปฏิกิริยาการเปลี่ยนไพรูเวตเป็นอะซิทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) ในกระบวนการหมักน้ำตาลของยีสต์ หรือในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลฟาคีโทกลูทาเรต (α-ketoglutarate) เป็นซักซินิลโคเอ (succinyl CoA) ในวัฏจักรเครบส์และปฏิกิริยาการเปลี่ยนไรโบส-5-ฟอสเฟต (ribose-5-phosphate) เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวิถีไกลโคลิซิส และกระบวนการสร้าง aromatic amino acids ในวิถีเพนโทสฟอสเฟต (Hohmann & Meacock, 1998) ซึ่งกระบวนการนี้ไทอามีนไดฟอสเฟตมีส่วนในการสร้างน้ำตาลไรโบสและ NADP (ภาพที่ 2-4) นอกจากนี้ ThDP ยังมีบทบาทในสรีรวิทยาของระบบประสาท เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการส่งสัญญาณประสาทไปตามเส้นใยประสาท และมีความสำคัญในการสังเคราะห์อะเซทิลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาททำให้ผู้ที่ขาดไทอามีนมีอาการทางระบบประสาท เช่น เหน็บชา เบื่ออาหารและอ่อนล้า เป็นต้น (นภา หลิมรัตน์, 2555)



ภาพที่ 2-3 กระบวนการสังเคราะห์ไทอามีนและอนุพันธ์ (ที่มา Rapala-Kozik et al., 2007)



ภาพที่ 2-4 บทบาทของไทอามีนไดฟอสเฟตในวิถีเมตาบอลิซึม
(ที่มา Hohmann & Meacock, 1998)

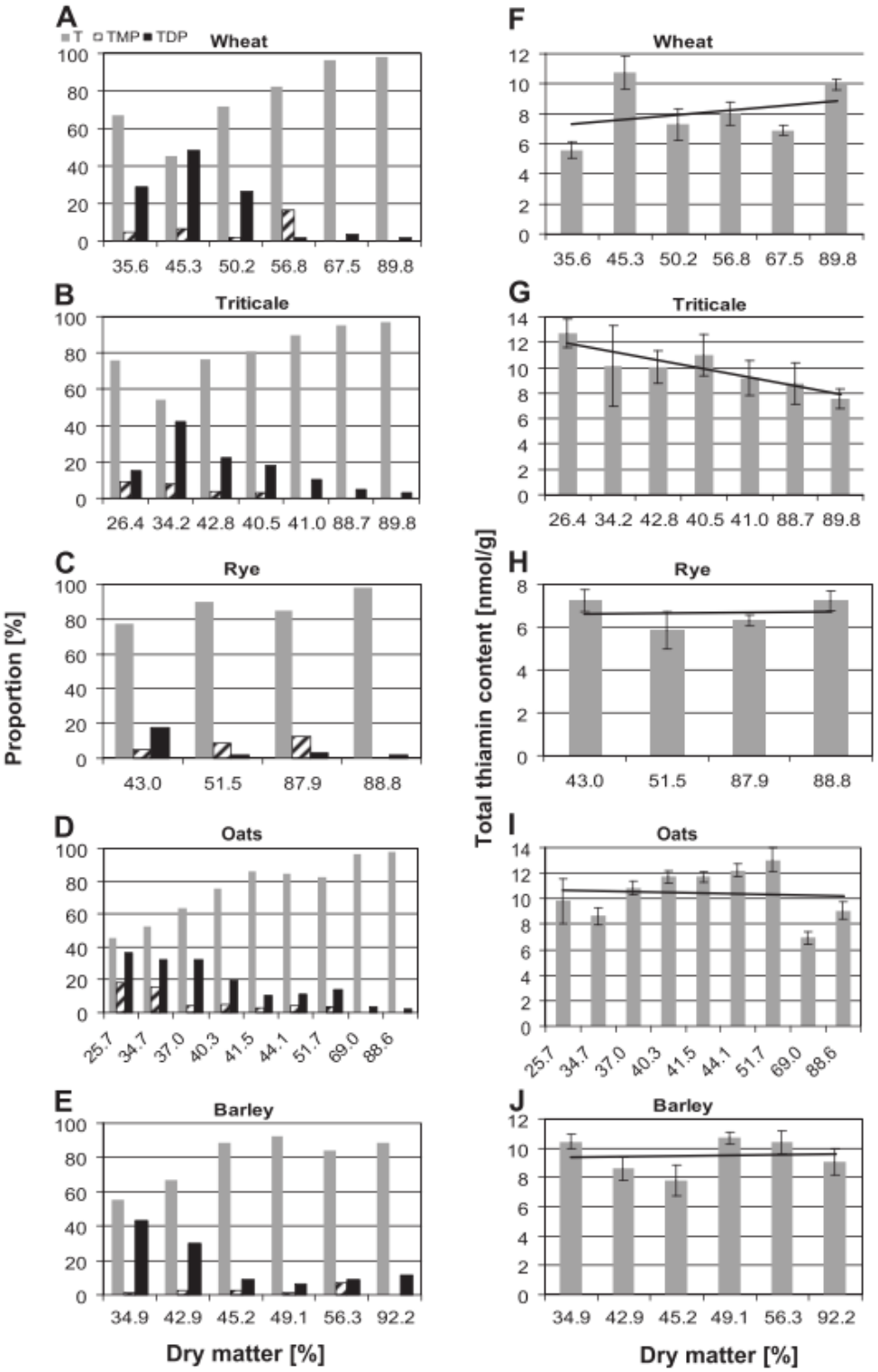
2.6 ปริมาณไทอามีนในเมล็ดธัญพืช

ไทอามีนเป็นวิตามินที่พบได้มากในเมล็ดธัญพืช ซึ่งพบความผันแปรของไทอามีนค่อนข้างสูงจากชนิดและสายพันธุ์ของธัญพืชที่ต่างกัน จากรายงานของ Lebiedzi**ń**ska and Szefer (2006) ศึกษาปริมาณไทอามีนรวม (ไทอามีนและอนุพันธ์) ในเมล็ดธัญพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เมล็ดทานตะวัน ถั่วเหลือง งา ข้าวบาร์เลย์และข้าวกล้อง พบว่ามีปริมาณไทอามีนเท่ากับ 1.050, 0.912, 0.715, 0.356 และ 0.264 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ จากรายงานของ Golda, Szyniarowski, Ostrowska, Kozik, and Rapala-Kozik (2004) ศึกษาในถั่วลันเตา ข้าวโอ๊ต ถั่วปากอ้าและข้าวโพด พบว่ามีปริมาณไทอามีนประมาณ 0.329, 0.310, 0.271 และ 0.236 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ ข้าวทริทิเคลี ข้าวสาลีและข้าวไรน์มีไทอามีนประมาณ 0.258, 0.215 และ 0.184 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ (Buchholz et al., 2012) นอกจากนี้มีการศึกษาปริมาณไทอามีนรวมในข้าวไทยสายพันธุ์ต่างกัน 9 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมกัญญา ข้าวหอมนิล ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวเล้าแตก ข้าวสินเหล็กและข้าวหอมอุบล พบว่าข้าวสายพันธุ์ต่างกันมีความผันแปรของไทอามีนในช่วง 0.164-0.317 มิลลิกรัม/100 กรัม ข้าวที่มีปริมาณไทอามีนสูงที่สุดคือ ข้าวหอมกัญญาและข้าวสินเหล็กในขณะที่ข้าวเหนียวดำมีปริมาณไทอามีนต่ำที่สุด (Rujirapisit, Sangkaeo, & Leowsakulrat, 2012) การศึกษาในข้าวสาลี 49 สายพันธุ์ พบว่าค่าเฉลี่ยของไทอามีนคือ 0.38 มิลลิกรัม/ 100 กรัม

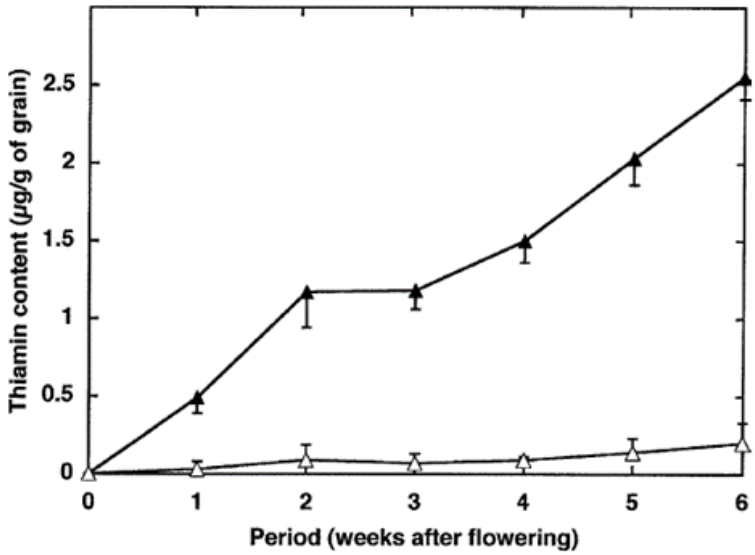
โดยพันธุ์ที่มีไทอามีนต่ำสุดคือ Virtuose มีปริมาณ 0.26 มิลลิกรัม/ 100 กรัมและพันธุ์ที่มีปริมาณของไทอามีนมากที่สุดคือ Poeme มีปริมาณ 0.61 มิลลิกรัม/ 100 กรัม พบความผันแปรถึง 0.35 มิลลิกรัม/ 100 กรัม (Batifoulier et al., 2006)

2.7 การสังเคราะห์ไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดธัญพืช

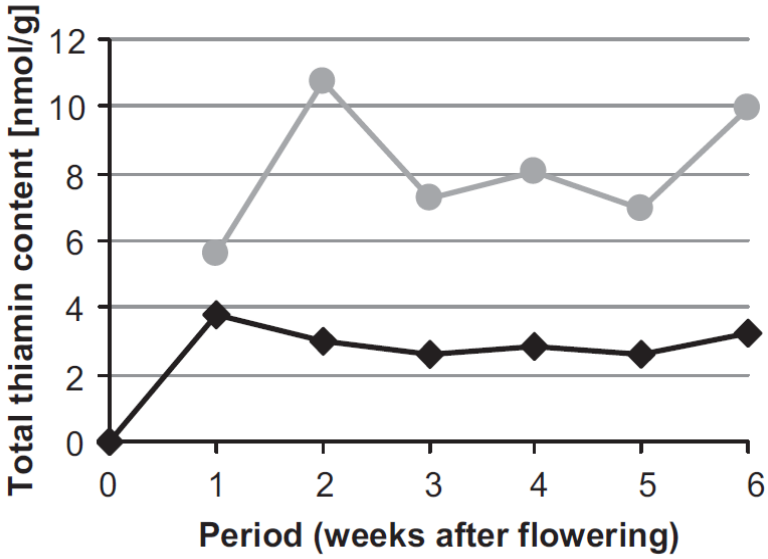
จากการศึกษาปริมาณของไทอามีนในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ข้าวทริทิเคลี (Triticosecale) ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) ข้าวไรน์ (*Secale cereal* L.) ข้าวโอ๊ต (*Avena sativa* L.) และเมล็ดงา (*Sesamum indicum* L.) พบว่าไทอามีนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตลอดระยะการพัฒนาของเมล็ดหลังจากดอกบาน ขณะที่ปริมาณของไทอามีนโมโนฟอสเฟตและไทอามีนไดฟอสเฟตลดลงในธัญพืชอีก 5 ชนิดและคงที่ในเมล็ดงา(ภาพที่ 2-5, 2-6) ในข้าวสาลี (Triticum aestivum) 2 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ Norin 61 และพันธุ์ Dekan พบว่าพันธุ์ Norin มีการสร้างไทอามีนมากที่สุดในช่วงสัปดาห์แรกของการเจริญหลังจากดอกบาน ข้าวสาลีพันธุ์ Dekan มีการสร้างไทอามีนมากกว่าพันธุ์ Norin 61 แต่อัตราการสร้างไม่คงที่ เนื่องจากมีการสร้างไทอามินสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 แล้วลดลงในสัปดาห์ต่อมาและเพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 6 (ภาพที่ 2-7) นอกจากนี้มีการศึกษาในเมล็ดงาพบว่าเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์โปรตีนที่จับกับไทอามีน (thiamin-binding protein; TBPs) และการจับของไทอามีนกับโปรตีน (thiamine-binding activity) เพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 2-8) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไทอามีนจะถูกสะสมโดยจับอยู่กับโปรตีนในระยะที่เมล็ดเจริญเต็มที่จนถึงระยะพักตัว เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการเจริญเติบโตระหว่างกระบวนการงอก ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางอิมมูนวิทยา พบว่าในเมล็ดข้าว ข้าวสาลีและข้าวบาร์เลย์มีการสะสมโปรตีนที่จับกับไทอามีนและไทอามีนบริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ด (aleurone layer) (Buchholz et al., 2012; Mundy et al., 1986; Tanaka, Sugimoto, Ogawa, & Kasai, 1980; Watanabe et al., 2004; Watanabe, Takahashi, Ampo, & Mitsunaga, 2003)



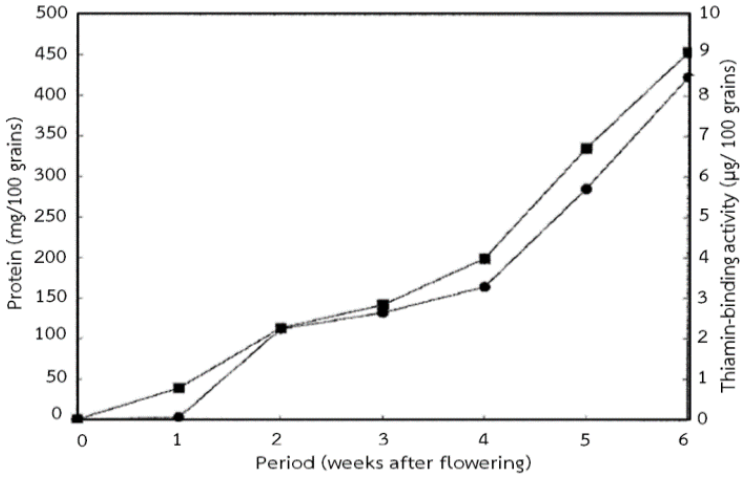
ภาพที่ 2-5 การเปลี่ยนแปลงของไทอามีนและอนุพันธ์ระหว่างการพัฒนาของเมล็ด (A) ข้าวสาลี (B) ข้าวทริทิเคลี (C) ข้าวไรน์ (D) ข้าวโอ๊ตและ (E) ข้าวบาร์เลย์ (F-J) แสดงการเปลี่ยนแปลงของไทอามีนรวม (ที่มา Buchholz et al., 2012)



ภาพที่ 2-6 การเปลี่ยนแปลงของไทอามีน (▲) และอนุพันธ์ (△) ในเมล็ดงาขณะเมล็ดพัฒนา (ที่มา Watanabe et al., 2003)



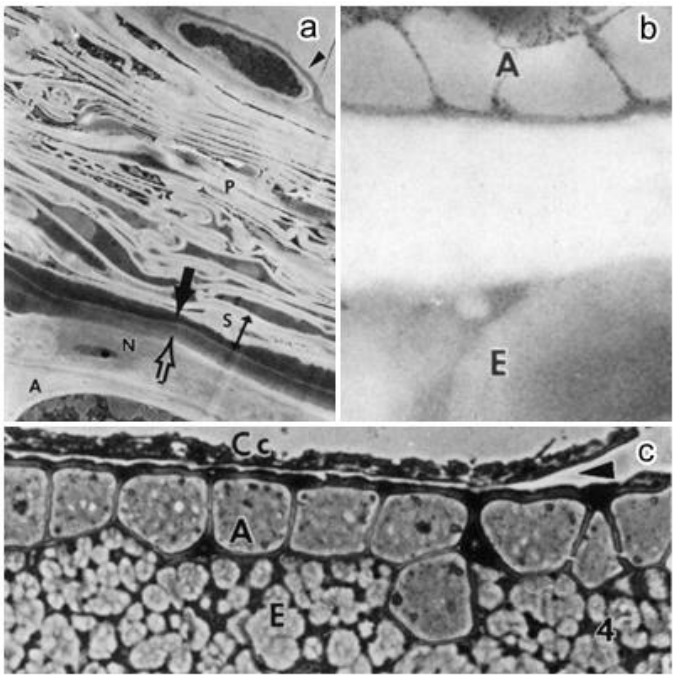
ภาพที่ 2-7 การเปลี่ยนแปลงของไทอามีนระหว่างการพัฒนาของเมล็ดหลังจากดอกบานในข้าวสาลี (*Triticum aestivum)* สองพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Norin 61 (◆) และพันธุ์ Dekan (●) (ที่มา Buchholz et al., 2012)



ภาพที่ 2-8 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนที่จับกับไทอามีน (●) และการจับของไทอามีนกับโปรตีน (■) ของเมล็ดงาระหว่างการพัฒนาหลังจากดอกบาน (ที่มา Watanabe et al., 2003)

2.8 การศึกษาโครงสร้างของเมล็ดข้าว

Bechtel and Pomeranz (1978) ทำการศึกษาโครงสร้างของเมล็ดข้าวกล้อง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) รายงานว่าเมล็ดข้าวกล้อง ประกอบด้วย ส่วนของเปลือกเมล็ด (caryopsis coat) ซึ่งแบ่งออกเป็น เนื้อเยื่อชั้นนอก (pericarp) เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) และเนื้อเยื่อชั้นนิวเซลลัส (nucellus layer) โดยเนื้อเยื่อชั้นนอกจะมีความหนาประมาณ 10 ไมโครเมตร เยื่อหุ้มเมล็ดจะถัดเข้ามาภายในเป็นเซลล์ชั้นเดียว หนาประมาณ 0.5 ไมโครเมตร ติดกับชั้นของนิวเซลลัสมีความหนาประมาณ 2.5 ไมโครเมตร (ภาพที่ 2-7a) และส่วนของเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ซึ่งแบ่งออกเป็นส่วนของเยื่อหุ้มชั้นใน (aleurone layers) เป็นชั้นนอกสุดของเนื้อเยื่อเอนโดสเปิร์มทำหน้าที่ห่อหุ้มคัพภะ (modified aleurone layer) และเอนโดสเปิร์มที่สะสมแป้ง (starchy endosperm) เซลล์ที่ห่อหุ้มส่วนของเอนโดสเปิร์มเป็นเซลล์หนาเรียงตัวชั้นเดียวภายในมีไขมันและโปรตีน (ภาพที่ 2-9c) ซึ่งบริเวณชั้นสุดท้ายของเยื่อหุ้มชั้นในจะมีผนังเซลล์ที่แยกเยื่อหุ้มชั้นในออกจากส่วนของเอนโดสเปิร์ม (ภาพที่ 2-9b)



ภาพที่ 2-9 โครงสร้างของเมล็ดข้าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (a) โครงสร้างของเปลือกเมล็ด (caryopsis coat) ของข้าวกล้อง (b) ผนังเซลล์ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในและเอนโดสเปิร์มและ (c) โครงสร้างบริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของข้าวกล้อง (aleurone layer) (pericarp; P, seed coat; S, nucellus; N, aleurone layer; A, caryopsis coat; Cc, starchy endosperm; E) (ที่มา Bechtel & Pomeranz, 1978)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกข้าว

- จานเพาะเชื้อ
- กระดาษเพาะเมล็ด
- อ่างซีเมนต์ ขนาด 80 × 80 × 30 เซนติเมตร
- กระถางปลูก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 26 เซนติเมตร
- ปุ๋ยออสโมโคส สูตร 13-13-13 (ยี่ห้อโซตัส)

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง (Sartorius, RC210S)
- ใบมีดโกน
- โกร่งบดตัวอย่าง
- กระดาษทราย เบอร์ 240
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, CX31)
- กล้องสเตอริโอ (Optika, SZM-1)
- กล้องถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (OMAX, A3550U)
- เครื่องสแกนแนวราบ
- ปิเปตแก้วขนาด 5 มิลลิลิตร
- เครื่องล้างอุลตร้าโซนิค
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer; Biochrom Libra S11)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (eppendorf, 5418 R)
- เครื่องดูดปล่อยสารอัตโนมัติ (autopipette)
- เครื่องโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง (HPLC, Agilent Infinity 1260)
- เครื่องวัดพีเอส (EUTECH, pH 700)
- เครื่องกวนสารละลายและให้ความร้อน (magnetic stirrer)
- ชุดอุปกรณ์รีฟลักซ์
- ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร

- หลอดทดลองขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองขนาด 5 และ 10 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)
- สารละลายไอโอดีน (iodine)
- Dowex 50Wx8 hydrogen form
- กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid)
- ฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ (diphosphorus pentoxide)
- ไทแอโซลเอทานอล (4-methyl-5-thiazoleethanol)
- อะซีโตน (acetone)
- แมกนีเซียมออกไซด์ (magnesiumoxide)
- แอมโมเนีย (ammonia)
- แอมโมเนียมคลอไรด์ (ammoniam chloride)
- แอมโมเนียบัฟเฟอร์ (NH_4Cl-$NH_3 \cdot H_2O$ buffer, pH 7.7)
- โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol)
- บรอมไธมอลบลู (bromothymol blue)
- ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (thiamine hydrochloride)
- ไทอามีนโมโนฟอสเฟต (thiamine monophosphate)
- ไทอามีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate)
- อะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile, HPLC-grade)
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer, pH 5.6)
- โมโนโซเดียมฟอสเฟต (monosodium phosphate)
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate)
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ (Tris-HCl, pH 7.5)
- สารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford's reagent)
- โบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน (bovine serum albumin)

- ไฮดรอกซีเมทิลไพริมิดีน (hydroxymethylpyrimidine; HMP)
- ไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต (hydroxyethylthiazole monophosphate,HET-P)
- อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP)
- แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride)
- กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)
- โซเดียมอะซีเตท (sodium acetate)
- เอนไซม์ทาคาไดแอสเทส (takadiastase)

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

แผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

พันธุ์ข้าวและวิธีการปลูก

นำเมล็ดข้าวทั้ง 30 พันธุ์ ได้แก่ กข1 กข3 กข7 กข9 กข11 กข15 กข23 กข29 กข31 กข 41 กข43 กข49 สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 2 สุพรรณบุรี 3 สุพรรณบุรี 60 สุพรรณบุรี 90 ชัยนาท 1 ชัยนาท 2 ปทุมธานี 1 ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวเจ้าหอมสุพรรณ ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 1 ล้นยุ้ง เหลืองอ่อน ขาวตาหวิน พัทลุง หอมแดง เหลืองปะทิว พิษณุโลก 2 เพาะบนกระดาษเพาะเมล็ดที่มีความชื้นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นย้ายต้นกล้าข้าวลงปลูกในกระถางพลาสติก 1 ต้นต่อ 1 กระถางพลาสติกที่บรรจุดิน 1000 กรัมต่อปุ๋ยออสโมโคส (Osmocote) สูตร 13-13-13 จำนวน 10 กรัม โดยปลูกพันธุ์ละ 4 ต้น นำกระถางพลาสติกแช่ลงในอ่างซีเมนต์ให้น้ำอยู่ที่ระดับผิวดิน เก็บเกี่ยวเมื่อรวงสุกเต็มที่

การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธีการทางสเปกโตโฟโตเมตรี (spectrophotometry)

การหาปริมาณไทอามีนรวมจากเมล็ดข้าว 30 พันธุ์ ทำด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Liu et al. (2002) โดยนำตัวอย่างเมล็ดข้าวต้นละ 5 เมล็ดบดให้ละเอียด นำไปชั่งน้ำหนักจากนั้น

นำตัวอย่างที่ได้ใส่ในโกร่ง เติมน้ำกลั่น 750 ไมโครลิตร บดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 30 ไมโครลิตร มาเติม NH_4Cl-NH_3•H_2O buffer pH 7.7 ปริมาตร 240 ไมโครลิตร 1% polyvinyl alcohol ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ 0.05% bromothymol blue ปริมาตร 240 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1410 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร หาปริมาณไทอามีนรวมในตัวอย่างโดยนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (thiamine hydrochloride, Sigma)

เมื่อทำการหาปริมาณไทอามีนในข้าวครบ 30 พันธุ์ จะทำการคัดเลือกข้าวทั้งหมด 6 พันธุ์คือพันธุ์ที่มีปริมาณไทอามีนรวมมากที่สุด ปานกลางและน้อยที่สุด อย่างละ 2 พันธุ์ เพื่อนำมาศึกษาปริมาตรของเมล็ดข้าวกล้อง ความหนาแน่นและปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ความหนาและปริมาตรชั้นรำ ปริมาณไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้องและปริมาณไทอามีน ไทอามีนโมโนฟอสเฟต ไทอามีนไดฟอสเฟตและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

การทดลองที่ 2 การศึกษาความหนาของชั้นรำ ปริมาตรชั้นรำ ปริมาตรของเมล็ดข้าวกล้อง ปริมาตรเอนโดสเปิร์มและความหนาแน่นของเอนโดสเปิร์ม

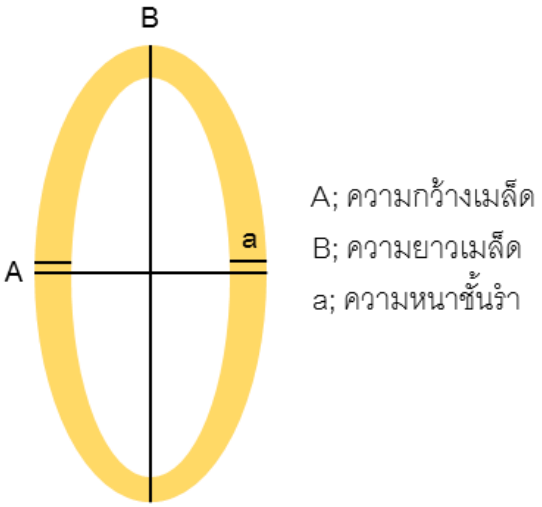
การศึกษาความหนาและปริมาตรของชั้นรำข้าว

ทำการหาปริมาตรของชั้นรำข้าวโดยดัดแปลงจากวิธีของ Dalen (2005) นำเมล็ดข้าวที่นำส่วนของแกลบออกแล้ว ต้นละ 10 เมล็ด (พันธุ์ละ 4 ซ้ำ) จากนั้นนำมาตัดตามขวาง (cross section) ย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วยสารละลายไอโอดีน จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วัดความหนาของชั้นรำด้วยโปรแกรม imageJ (ภาพที่ 3-1)
โดยปริมาตรชั้นรำหาได้จากสมการ

ปริมาตรชั้นรำ = ปริมาตรเมล็ดทั้งหมด – ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม

ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม = 0.66 × พื้นที่ × {ความกว้าง - (2 × ความกว้างชั้นรำ)}

พื้นที่ = π × {(ความกว้าง/2) - ความกว้างชั้นรำ} × {(ความยาว/2) - ความกว้างชั้นรำ}



ภาพที่ 3-1 ตัวอย่างการวัดความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด และความหนาชั้นรำ

การศึกษาปริมาตรของเมล็ดข้าวกล้อง

ทำการหาปริมาตรของเมล็ดข้าวตามวิธีของ Dalen (2005) โดยนำเมล็ดข้าวที่นำส่วนของเปลือกออกแล้วสแกนด้วยเครื่องสแกนแนวราบ โดยใช้ตัวอย่างเมล็ดข้าวต้นละ 10 เมล็ด (พันธุ์ละ 4 ซ้ำ) จากนั้นทำการวัดความกว้าง ความยาวของเมล็ดด้วยโปรแกรม imageJ นำไปคำนวณหาปริมาตร โดยแทนค่าลงในสมการ

ปริมาตร = 0.66 × พื้นที่ × ความกว้าง

พื้นที่ = π × (ความกว้าง/2) × (ความยาว/2)

การศึกษาความหนาแน่นของเอนโดสเปิร์มด้วยวิธีการแทนที่น้ำ

นำปิเปตขนาด 5 มิลลิลิตรอุดด้วยพาราฟินบริเวณปลายเพื่อไม่ให้น้ำไหลออก บันทึกปริมาตรน้ำเริ่มต้น จากนั้นนำเมล็ดข้าวกล้องจำนวน 20 เมล็ดมาขัดส่วนของรำออกโดยใช้กระดาษทรายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ นำเมล็ดข้าวขาวมาชั่งน้ำหนักจากนั้นใส่ลงในปิเปต นำปิเปตที่มีเมล็ดข้าวใส่ลงในเครื่องล้างอุลตร้าโซนิคเพื่อไล่อากาศที่ติดอยู่บริเวณผิวเมล็ดข้าวเป็นเวลา 15 นาที ที่ความถี่ 40 kHz อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสบันทึกปริมาตรน้ำที่เพิ่มขึ้น การหาความหนาแน่นของเอนโดสเปิร์มด้วยวิธีการแทนที่น้ำสามารถคำนวณได้จากสูตร

ความหนาแน่น (ρ) = มวล (g) / ปริมาตร (ml)

การทดลองที่ 3 การศึกษาปริมาณไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้องและในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

นำข้าวทั้ง 6 พันธุ์ปลูกเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น โดยจะเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าว 4 ระยะ คือ ระยะดอกบาน (flowering stage) ระยะข้าวน้ำนม (milky stage) (7-10 วันหลังดอกบาน) ระยะข้าวเม่า (dough stage) (10-20 วันหลังดอกบาน) และระยะเก็บเกี่ยว (maturity stage) (20-35 วันหลังดอกบาน) นำเมล็ดข้าวแต่ละระยะมาสกัดและหาปริมาณของไทอามีนด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC)

การสกัดและศึกษาปริมาณไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้อง

การหาปริมาณไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดกล้อง ได้แก่ ส่วนของเมล็ดทั้งหมด (ข้าวกล้อง) เอนโดสเปิร์ม (ข้าวขาว) เอ็มบริโอและส่วนของชั้นรำ โดยนำเมล็ดข้าวกล้องมาเก็บส่วนของเอ็มบริโอโดยใช้มือแกะ นำกระดาษทรายมาขัดชั้นรำออกเพื่อให้เหลือแต่ส่วนของเอนโดสเปิร์ม นำเมล็ดข้าวกล้อง ข้าวขาวและเอ็มบริโอ จำนวนอย่างละ 20 เมล็ดชั่งน้ำหนัก จากนั้นบดให้ละเอียดสกัดไทอามีน ด้วยน้ำปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรโดยใช้โกร่งบดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 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 องศาเซลเซียส 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

การสกัดและศึกษาปริมาณไทอามีนไทอามีน ไทอามีนโมโนฟอสเฟตและไทอามีนไดฟอสเฟตในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

สกัดไทอามีนจากเมล็ดข้าวทั้ง 4 ระยะ ได้แก่ ระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยวที่ประกอบด้วย lemma และ palea จำนวนต้นละ 20 เมล็ด บดเมล็ดข้าวด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วสกัดด้วยน้ำ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร โดยใช้โกร่งบดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm, 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาทีเก็บสารละลาย

ส่วนใสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไทอามีน ไทอามีนโมโนฟอสเฟตและไทอามีนไดฟอสเฟตด้วยเครื่อง HPLC เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น

การทดลองที่ 4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีนในเมล็ดข้าวที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

การสกัดและหาปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวที่ประกอบด้วย lemma และ palea ทั้ง 4 ระยะจำนวน 48 เมล็ด มาสกัดโปรตีนด้วย 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford's assay ใช้สารสะลายส่วนใส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายแบรดฟอร์ดปริมาตร 1,450 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 595 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์หาปริมาณโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน

การสังเคราะห์สารตั้งต้นไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต (HET-P)

สังเคราะห์ HET-P จากสารตั้งต้น 4-methyl-5-thiazoleethanol วิธีของ Leichssenring and Schmidt (1962) โดยเติมกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 16 มิลลิลิตร ฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ 24.5 กรัม ลงในขวดก้นกลม เติม 4-methyl-5-thiazoleethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งชุดอุปกรณ์รีฟลักซ์พร้อมให้ความร้อนประมาณ 135-140 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นตั้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ละลายสารที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 32 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายที่ได้ใส่ในอะซิโตน ปริมาตร 120 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 120 มิลลิลิตร และแมกนีเซียมออกไซด์ 3.4 กรัม คนสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง magnetic stirrer ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วยสารละลายแอมโมเนีย นำสารละลายที่ได้กรองผ่านคอลัมน์ขนาด 3x10 เซนติเมตร บรรจุ Dowex 50Wx8 hydrogen form ใช้น้ำเป็นตัวชะ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทีละ 10 มิลลิลิตร (fraction) จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาตรวจสอบเบื้องต้นภายใต้รังสี UV นำสารละลายส่วนที่มีการเรืองแสง UV มาระเหยน้ำออกด้วยวิธีฟรีซดรายแบ่งตะกอนที่ได้ประมาณ 10 มิลลิกรัมเพื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase

การหากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Kawasaki, Nosaka, Kaneko, Nishimura, and Iwashima (1990) และ Rapala-Kozik et al. (2008), 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 rpm 15 นาที เพื่อแยกโปรตีนที่เสียสภาพออก ปรับ pH ของสารละลายส่วนใสให้เป็น 4.5 ด้วย 4 M โซเดียมอะซีเตท จากนั้นอนุพันธ์ของไทอามีน (thiamine phosphates) จะถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolysed) ไปเป็นไทอามีนโดยการเติม 1% takadiastase 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณไทอามีนด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีข้างต้นโดยใช้คอลัมน์ C-18 (Luna® 5 µm C18(2) 100 Å, LC Column 250 x 4.6 mm, Ea)

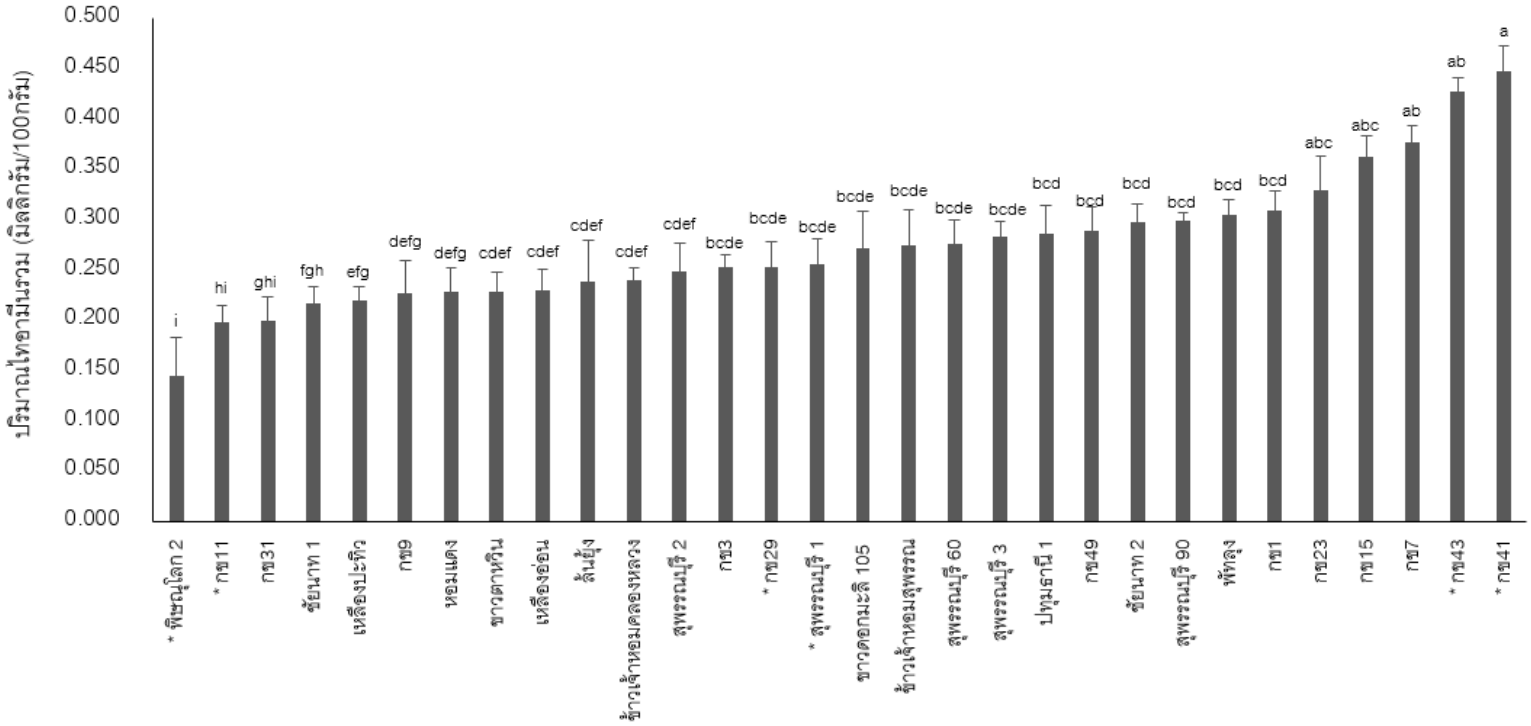
บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธีการทางสเปกโตโฟโตเมตรี

การหาปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง 30 พันธุ์

จากการนำเมล็ดข้าวกล้องในระยะเก็บเกี่ยวจำนวน 30 พันธุ์ มาสกัดและศึกษาปริมาณไทอามีนรวมด้วยวิธีการทางสเปกโตโฟโตเมตรี แสดงให้เห็นว่าข้าวกล้องทั้ง 30 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางภาคผนวก 1) ซึ่งเมล็ดข้าวกล้อง 5 พันธุ์มีปริมาณของไทอามีนรวมมากที่สุด คือกข41 กข43 กข7 กข15 และ กข23 รองลงมาได้แก่ 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 ชัยนาท 1 และข้าวกล้อง 3 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนรวมน้อยที่สุด คือ กข31 กข11 และพิษณุโลก 2 (ภาพที่ 4-1) โดยข้าวกล้องทั้ง 30 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนรวมอยู่ในช่วง 0.144-0.447 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งมีไทอามีนรวมเฉลี่ยเท่ากับ 0.274 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

จากการศึกษาปริมาณไทอามีนรวมสามารถแบ่งพันธุ์ข้าวจากปริมาณไทอามีนรวมได้ทั้งหมด 9 กลุ่ม (ตารางภาคผนวกที่ 2) จึงทำให้สามารถเลือกพันธุ์ที่มีปริมาณไทอามีนรวมในกลุ่มสูง ปานกลางและต่ำอย่างละ 2 พันธุ์ได้ทั้งหมด 6 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์ 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 เนื่องจากมีรายงานว่าไทอามีนและอนุพันธ์สะสมอยู่มากบริเวณชั้นรำ (เยื่อหุ้มชั้นในรวมกับเปลือกเมล็ด) จึงนำข้าวกล้อง 6 พันธุ์มาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไทอามีนรวมกับความหนาของชั้นรำ ปริมาตรของเมล็ดข้าวกล้อง ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรชั้นรำ และความหนาแน่นของเอนโดสเปิร์มต่อไป



ภาพที่ 4-1 ปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง 30 พันธุ์ (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT); *, พันธุ์ข้าวที่มีปริมาณไทอามีนรวมในกลุ่มสูง ปานกลางและต่ำ)

การทดลองที่ 2 การหาความหนาของชั้นรำ ปริมาตรของเมล็ดข้าวกล้อง ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรชั้นรำและความหนาแน่นของเอนโดสเปิร์ม

การหาความหนาของชั้นรำข้าว

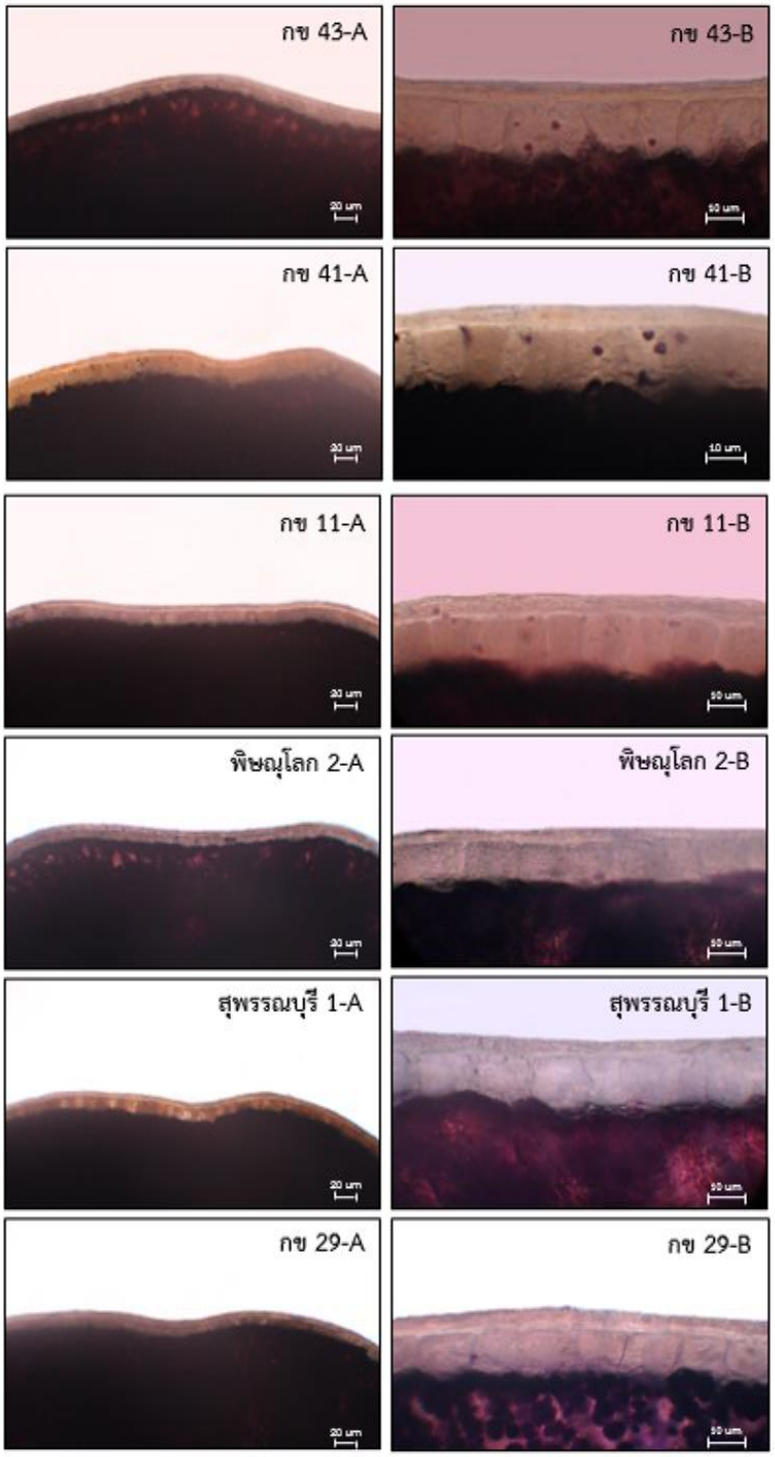
จากการศึกษาความหนาชั้นรำข้าวด้วยวิธีตัดตามขวาง (cross-section) แล้วย้อมสีตัวอย่างด้วยสารละลายไอโอดีน เพื่อให้ส่วนของเอนโดสเปิร์มและส่วนของชั้นรำสังเกตได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-2) พบว่าข้าวกล้อง 6 พันธุ์มีความหนาชั้นรำข้าวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อวัดด้วยโปรแกรม image J ที่กำลังขยาย 40x พันธุ์กข43 มีชั้นรำหนาที่สุดคือ 0.051 มิลลิเมตร รองลงมาได้แก่พันธุ์กข41 กข11 พิษณุโลก 2 สุพรรณบุรี 1 และกข29 มีความหนาชั้นรำเท่ากับ 0.048, 0.043, 0.041, 0.041 และ 0.036 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4-1) (ตารางภาคผนวกที่ 4)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหนาชั้นรำกับปริมาณไทอามีนรวมของข้าวทั้ง 6 พันธุ์ ด้วยการวิเคราะห์สัมประสิทธิสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน พบว่าความหนาชั้นรำมีความสัมพันธ์กับปริมาณของไทอามีนรวมขนาด 0.68 (ภาพที่ 4-3) กล่าวคือเมื่อความหนาชั้นรำมากขึ้นปริมาณไทอามีนรวมจะเพิ่มสูงขึ้น

ตารางที่ 4-1 ความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด ความหนาชั้นรำ และปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง 6 พันธุ์ (n=40) (ค่าเฉลี่ย±SE)

พันธุ์	ความกว้าง (มม.)	ความยาว (มม.)	ความหนาชั้นรำ (มม.)	ปริมาณไทอามีนรวม (มก./100ก)
กข41	1.816±0.059	7.028±0.192	0.048±0.002b	0.447±0.039a
กข43	2.013±0.060	7.462±0.167	0.051±0.002a	0.428±0.017a
สุพรรณบุรี 1	1.841±0.063	6.886±0.132	0.041±0.001c	0.255±0.037b
กข29	2.053±0.048	7.199±0.146	0.036±0.001d	0.253±0.035b
กข11	1.925±0.059	7.277±0.169	0.043±0.001c	0.198±0.013bc
พิษณุโลก 2	1.912±0.081	7.164±0.216	0.041±0.002c	0.144±0.026c

[(1)]ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษร แสดงผลการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT



ภาพที่ 4-2 ภาพตัดตามขวางของเมล็ดข้าวกล้อง 6 พันธุ์ที่ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แสดงส่วนของชั้นรำ (bran layer) และส่วนของเอนโดสเปิร์ม (endosperm) (A) ความหนาชั้นรำที่กำลังขยาย 10X; (B) ความหนาชั้นรำที่กำลังขยาย 40X

การหาปริมาตรเมล็ดข้าวกล้อง ปริมาตรเอนโดสเปิร์มและปริมาตรชั้นรำข้าว

ปริมาตรเมล็ดข้าวกล้องคำนวณได้จากความกว้างและความยาวของเมล็ดตามวิธีของ Dalen (2005) ซึ่งจากการวัดความกว้างและความยาว (ตารางที่ 4-1) นำมาคำนวณหาปริมาตรเมล็ดข้าว พบว่าข้าวกล้อง 6 พันธุ์มีปริมาตรเมล็ดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 6) พันธุ์กข29 มีปริมาตรเมล็ดสูงที่สุดคือเท่ากับ 15.782 ลูกบาศก์มิลลิเมตร รองลงมาได้แก่ พันธุ์กข43 กข11 พิษณุโลก 2 สุพรรณบุรี 1 และพันธุ์ที่มีปริมาตรเมล็ดน้อยที่สุดคือกข41 มีปริมาตรเมล็ดเท่ากับ 15.740, 14.064, 13.717, 12.214 และ 12.073 ลูกบาศก์มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4-2) (ตารางภาคผนวกที่ 7) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรเมล็ดข้าวกล้องกับปริมาณของไทอามีนรวม พบว่าปริมาตรเมล็ดข้าวกล้องไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของไทอามีนรวม จากการทดสอบสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้ค่า p-value เท่ากับ 0.918 (ภาพที่ 4-3)(ตารางภาคผนวกที่ 8)

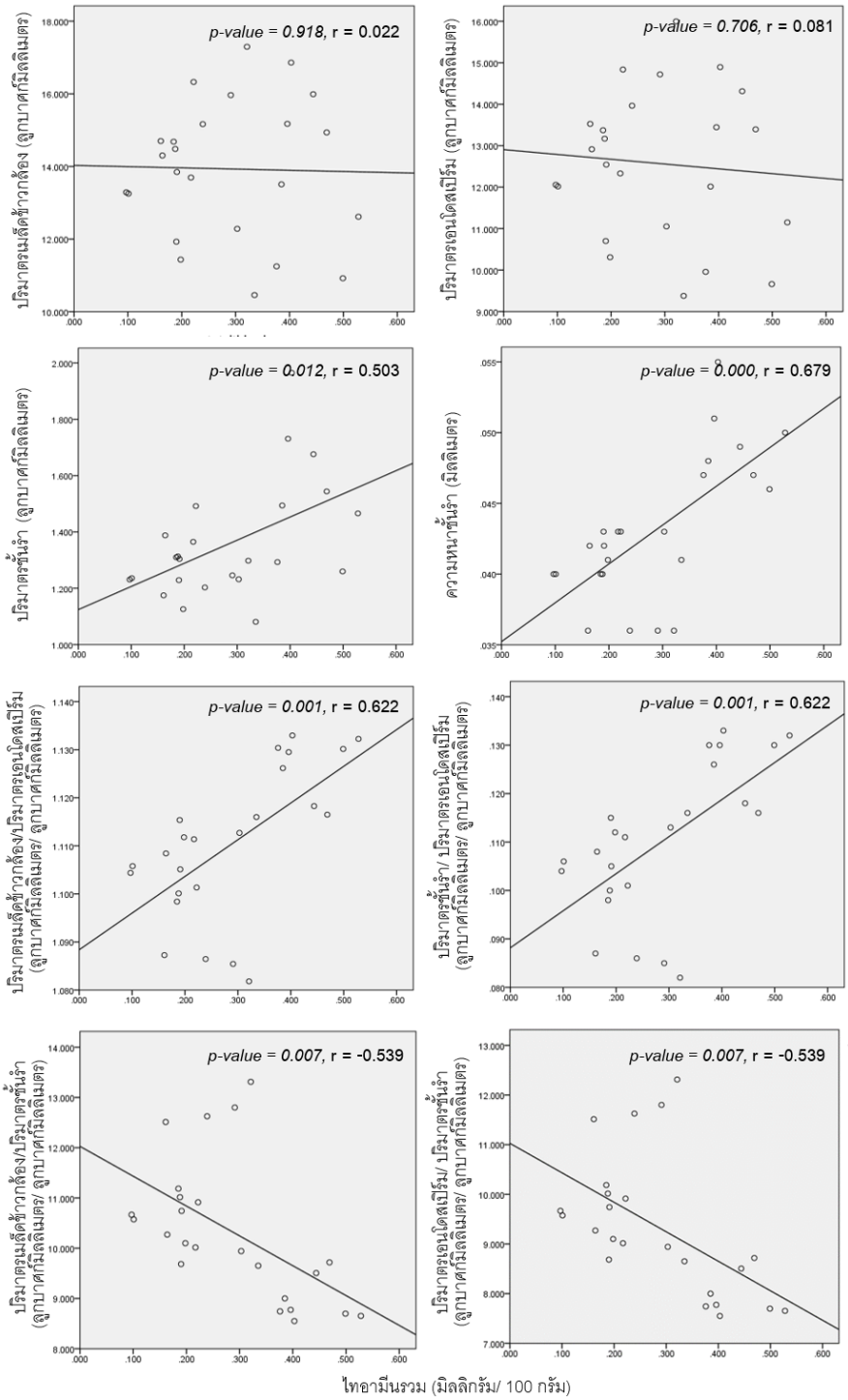
การหาปริมาตรเอนโดสเปิร์มจากความกว้างเมล็ดและความหนาชั้นรำ พบว่าข้าวกล้อง 6 พันธุ์ มีปริมาตรเอนโดสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 6) พันธุ์กข29 มีปริมาตรเอนโดสเปิร์มสูงที่สุดคือเท่ากับ 14.551 ลูกบาศก์มิลลิเมตร รองลงมาได้แก่ พันธุ์กข43 กข11 พิษณุโลก 2 สุพรรณบุรี 1 และพันธุ์ที่มีปริมาตรเอนโดสเปิร์มน้อยที่สุด คือ กข41 มีปริมาตรเท่ากับ 14.011, 12.695, 12.446, 11.027 และ 10.695 ลูกบาศก์มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4-2) (ตารางภาคผนวกที่ 9) จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิสหสัมพันธ์แบบเพียร์สันระหว่างปริมาณไทอามีนรวมกับปริมาตรของเอนโดสเปิร์ม พบว่าได้ค่า p-value เท่ากับ 0.706 (ภาพที่ 4-3) แสดงให้เห็นว่าปริมาตรเอนโดสเปิร์มไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณไทอามีนรวม (ตารางภาคผนวกที่ 10)

การหาปริมาตรชั้นรำข้าว จากปริมาตรเมล็ดและปริมาตรเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวกล้องพบว่าข้าวกล้อง 6 พันธุ์มีปริมาตรชั้นรำแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 6) ซึ่งสามารถแบ่งพันธุ์ข้าวได้ทั้งหมด 3 กลุ่มคือพันธุ์ที่มีปริมาตรชั้นรำมาก ได้แก่พันธุ์กข43 มีปริมาตรเท่ากับ 1.729 ลูกบาศก์มิลลิเมตร พันธุ์ที่มีปริมาตรชั้นรำปานกลาง ได้แก่ พันธ์กข41 กข11 พิษณุโลก 2 กข29 และพันธุ์ที่มีปริมาตรชั้นรำน้อยที่สุดคือพันธุ์สุพรรณบุรี 1 คือมีปริมาตร 1.378, 1.369, 1.271, 1.230 และ 1.187 ลูกบาศก์มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4-2) (ตารางภาคผนวกที่ 11) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไทอามีนรวมกับปริมาตรชั้นรำข้าว พบว่ามีความสัมพันธ์กันขนาด 0.50 (ภาพที่ 4-3) แสดงให้เห็นว่าปริมาณไทอามีนรวมขึ้นกับปริมาตรของชั้นรำข้าวในทางบวก (ตารางภาคผนวกที่ 12)

ตารางที่ 4-2 ปริมาตรเมล็ดข้าวกล้อง ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรชั้นรำ และปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง 6 พันธุ์ (n=40) (ค่าเฉลี่ย±SE)

พันธุ์	ปริมาตรเมล็ดข้าวกล้อง (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	ปริมาตรชั้นรำ (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	ปริมาณไทอามีนรวม (มก./100ก)
กข41	12.073±0.603b	10.695±0.545c	1.378±0.059b	0.447±0.039a
กข43	15.740±0.436a	14.011±0.362ab	1.729±0.088a	0.428±0.017a
สุพรรณบุรี 1	12.214±0.903b	11.027±0.853cd	1.187±0.052c	0.255±0.037b
กข29	15.782±0.568a	14.551±0.542a	1.230±0.027bc	0.253±0.035b
กข11	14.064±0.907a	12.695±0.854abc	1.369±0.054b	0.198±0.013bc
พิษณุโลก 2	13.717±0.289ab	12.446±0.269bcd	1.271±0.022bc	0.144±0.026c

[(1)]ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษร แสดงผลการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT



ภาพที่ 4-3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรเมล็ด ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรชั้นรำ ความหนาชั้นรำ สัดส่วนปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรชั้นรำ ปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาตรชั้นรำ และปริมาตรชั้นรำต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาณไทอามีนรวม

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณไทอามีนรวมจะสูงขึ้น เมื่อข้าวกล้องมีปริมาตรชั้นรำและความหนาชั้นรำมากขึ้น อย่างไรก็ตามข้าวกล้องแต่ละพันธุ์มีปริมาตรเมล็ดที่แตกต่างกัน ซึ่งปริมาตรเมล็ดข้าวกล้องขึ้นกับปริมาตรของเอนโดสเปิร์มรวมกับปริมาตรชั้นรำ จึงทำการศึกษาสัดส่วนระหว่างปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรชั้นรำ ปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาตรชั้นรำ และปริมาตรชั้นรำต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวกล้อง (ตารางที่ 4-3)

ข้าวกล้องพันธุ์กข41 มีสัดส่วนปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์มสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ กข43 สุพรรณบุรี 1 กข11 พิษณุโลก 2 และกข29 (1.130, 1.124, 1.110, 1.109, 1.104 และ 1.085 ลูกบาศก์มิลลิเมตร/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ)

ข้าวกล้องพันธุ์กข29 มีสัดส่วนปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรชั้นรำสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ พิษณุโลก 2 กข11 สุพรรณบุรี 1 กข43 และกข41 (12.813, 10.750, 10.221, 10.220, 9.137 และ 8.774 ลูกบาศก์มิลลิเมตร/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ)

ข้าวกล้องพันธุ์กข29 มีสัดส่วนปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาตรชั้นรำสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ พิษณุโลก 2 กข11 สุพรรณบุรี 1 กข43 และกข41 (11.813, 9.750, 9.221, 9.220, 8.137 และ 7.774 ลูกบาศก์มิลลิเมตร/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ)

ข้าวกล้องพันธุ์กข41 มีสัดส่วนปริมาตรชั้นรำต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์มสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ กข43 สุพรรณบุรี 1 กข11 พิษณุโลก 2 และกข29 (0.130, 0.124, 0.110, 0.109, 0.104 และ 0.085 ลูกบาศก์มิลลิเมตร/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสัดส่วนระหว่างปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรชั้นรำ ปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาตรชั้นรำ และปริมาตรชั้นรำต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวกล้อง ทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับปริมาณของไทอามีนรวม โดยพบว่าสัดส่วนของปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์มและปริมาตรชั้นรำต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์มมีความสัมพันธ์ขนาด 0.622 กับปริมาณไทอามีนรวม ขณะที่ทั้งปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรชั้นรำและปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาตรชั้นรำมีความสัมพันธ์ขนาด -0.539 (ภาพที่ 4-3) ซึ่งเป็นความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณไทอามีนรวม (ตารางภาคผนวกที่ 13) เป็นไปตามสมมุติฐานว่าไทอามีนและอนุพันธ์ถูกสะสมอยู่มากบริเวณชั้นรำ จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าข้าวกล้องแต่ละพันธุ์มีความหนาชั้นรำ ปริมาตรของชั้นรำ ปริมาตรเอนโดสเปิร์มและปริมาตรเมล็ดแตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการศึกษาไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้องเพื่อวิเคราะห์ความผันแปรของไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้องทั้ง 6 พันธุ์

ตารางที่ 4-3 สัดส่วนระหว่างปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรชั้นรำ ปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาตรชั้นรำ และปริมาตรชั้นรำต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวกล้องและปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวกล้อง 6 พันธุ์

พันธุ์	ปริมาตรเมล็ด/ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม	ปริมาตรเมล็ด/ปริมาตรชั้นรำ	ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม/ปริมาตรชั้นรำ	ปริมาตรชั้นรำ/ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม	ปริมาณไทอามีนรวม (มก./100ก)
กข41	1.130a	8.774c	7.774c	0.130a	0.447±0.039a
กข43	1.124a	9.137c	8.137c	0.124a	0.428±0.017a
สุพรรณบุรี 1	1.110b	10.220b	9.220b	0.110b	0.255±0.037b
กข29	1.085c	12.813a	11.813a	0.085c	0.253±0.035b
กข11	1.109b	10.221b	9.221b	0.109b	0.198±0.013bc
พิษณุโลก 2	1.104b	10.750b	9.750b	0.104b	0.144±0.026c

[(1)]ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษร แสดงผลการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT

การหาความหนาแน่นของเอนโดสเปิร์มด้วยวิธีการแทนที่น้ำ

ในกระบวนการสีข้าวเอาส่วนของชั้นรำออกเพื่อให้เหลือเพียงส่วนของเอนโดสเปิร์มจะมีเอนโดสเปิร์มบางส่วนที่ถูกขัดหายไปกับชั้นรำด้วย ส่งผลให้เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไทอามีนบนพื้นฐานของน้ำหนักเพียงอย่างเดียวอาจได้ค่าที่น้อยกว่าความเป็นจริง ดังนั้นจึงมีการวิเคราะห์หาความหนาแน่นและปริมาตรของเอนโดสเปิร์มด้วยวิธีการแทนที่น้ำเพื่อให้การศึกษาปริมาณไทอามีนในส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

จากการหาความหนาแน่นของเอนโดสเปิร์มโดยนำเมล็ดข้าวกล้องมาขัดส่วนของรำออกด้วยกระดาษทราย (ภาพผนวกที่ 2) แล้วนำไปแทนที่น้ำตามหลักการของอาร์คิมิดีส โดยนำปริมาตรน้ำที่เพิ่มขึ้นแทนค่าเพื่อหาความหนาแน่น พบว่าเอนโดสเปิร์มของข้าว 6 พันธุ์มีความหนาแน่นแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 14) โดยแบ่งกลุ่มความหนาแน่นเป็น 2 กลุ่ม คือ พันธุ์ที่มีความหนาแน่นมาก ได้แก่พันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีความหนาแน่นมากที่สุดคือ 1.480 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร พันธุ์พิษณุโลก 2 กข41 และกข11 (1.413, 1.389, 1.385 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรตามลำดับ) และพันธุ์ที่มีความหนาแน่นน้อยได้แก่ กข43 และพันธุ์กข29 มีความหนาแน่นของเอนโดสเปิร์มน้อยที่สุด (1.321 และ 1.135 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรตามลำดับ) (ตารางที่ 4-4) (ตารางภาคผนวกที่ 15) ซึ่งเมื่อนำปริมาตรที่ได้จากการแทนที่น้ำมาเปรียบเทียบทางสถิติแบบ One-way ANOVA กับปริมาตรเอนโดสเปิร์มที่ได้จากการแทนค่าสูตรด้วยวิธีตัดตามขวาง พบว่าปริมาตรเอนโดสเปิร์มที่ได้จากทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน (ตารางภาคผนวกที่ 16) และเมื่อนำมวลที่ได้จากการแทนค่าสูตรความหนาแน่นเท่ากับมวลต่อปริมาตร พบว่าข้าวกล้อง 6 พันธุ์มีมวลไม่แตกต่างกันทางสถิติที่นัยสำคัญ 0.05 (ตารางภาคผนวกที่ 17) พันธุ์กข 43 มีน้ำหนักเมล็ดมากที่สุด รองลงมาได้แก่ พิษณุโลก 2 กข11 กข29 สุพรรณบุรี 1 และกข41 โดยมีน้ำหนักเมล็ดเท่ากับ 18.5, 17.6, 17.4, 16.4, 16.3 และ 14.7 มิลลิกรัมต่อเมล็ด ตามลำดับ เปรียบเทียบทางสถิติระหว่างมวลที่ได้จากการแทนค่าสูตรกับมวลของเอนโดสเปิร์มที่ชั่งจริงได้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันของทั้งสองวิธี (ตารางผนวกที่ 18) เนื่องจากความละเอียดของเครื่องมือและจำนวนของเอนโดสเปิร์มที่ใช้ในการทดลองยังไม่เพียงพอให้เห็นความแตกต่างของน้ำหนักเอนโดสเปิร์มที่หายไปจากการสีได้

ตารางที่ 4-4 ความหนาแน่นเอนโดสเปิร์มและการเปรียบเทียบปริมาตรเอนโดสเปิร์มและน้ำหนักของเอนโดสเปิร์มจากวิธีแทนที่น้ำและตัดตามขวาง (n=80) (ค่าเฉลี่ย±SE)

พันธุ์	ความหนาแน่นเอนโดสเปิร์ม (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร)	ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม[ns] (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)		มวล[ns] (มิลลิกรัม/เมล็ด)	
		วิธีแทนที่น้ำ	ตัดตามขวาง	วิธีแทนที่น้ำ[ns]	ชั่งจริง
กข41	1.389±0.095a	11.250±0.722b	10.695±0.545c	14.7±0.6	15.4±0.5b
กข43	1.321±0.036ab	13.750±0.625a	14.011±0.362ab	18.5±0.4	18.9±0.4a
สุพรรณบุรี 1	1.480±0.018a	12.500±0.539ab	11.027±0.853cd	16.3±1.2	16.3±0.7bc
กข29	1.135±0.084b	14.380±0.722a	14.551±0.542a	16.4±0.7	15.4±0.4b
กข11	1.385±0.085a	11.250±1.021b	12.695±0.854abc	17.4±0.4	17.0±0.5bc
พิษณุโลก 2	1.413±0.070a	12.500±0.000ab	12.446±0.269bcd	17.6±1.2	17.6±0.9ab

[(ns)] ข้อมูลในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่นัยสำคัญ 0.05[(1)] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษร แสดงผลการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT

การทดลองที่ 3 การหาปริมาณไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้องและในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

การหาปริมาณไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้อง

การหาปริมาณไทอามีนจะศึกษาในส่วนของเมล็ดทั้งหมด (ข้าวกล้อง) เอนโดสเปิร์ม (ข้าวขาว) เอ็มบริโอ และส่วนของชั้นรำซึ่งปริมาณไทอามีนในชั้นรำสามารถหาได้จาก

ไทอามีนในข้าวกล้อง = ปริมาณไทอามีนในเอ็มบริโอ + ชั้นรำ + เอนโดสเปิร์ม

ซึ่งจากการศึกษาพบว่าข้าว 6 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนในเอ็มบริโอไม่แตกต่างกัน (ตารางภาคผนวกที่ 19) ซึ่งพิษณุโลก 2 มีไทอามีนสูงที่สุด รองลงมาได้แก่พันธุ์กข11 กข29 กข41 สุพรรณบุรี 1 และกข43 โดยมีไทอามีนอยู่ในช่วง 1.986-2.642 มิลลิกรัม/100 กรัม ขณะที่ปริมาณไทอามีนในชั้นรำและในเอนโดสเปิร์มของทั้ง 6 พันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value $\leq$ 0.05) (ตารางภาคผนวกที่ 20, 21) พันธุ์ที่มีปริมาณไทอามีนในชั้นรำมากที่สุดคือพันธุ์สุพรรณบุรี 1 รองลงมาได้แก่ กข11 กข41 พิษณุโลก 2 กข43 และกข29 ซึ่งความผันแปรไทอามีนในชั้นรำของข้าวทั้ง 6 พันธุ์อยู่ในช่วง 1.032-1.623 มิลลิกรัม/100 กรัม และพันธุ์ที่มีปริมาณไทอามีนในเอนโดสเปิร์มสูงที่สุดคือ กข43 รองลงมาได้แก่ กข41 กข11 สุพรรณบุรี 1 พิษณุโลก 2 และกข29 ไทอามีนมีความผันแปรอยู่ในช่วง 0.039-0.062 มิลลิกรัม/100 กรัม (ตารางที่ 4-5)

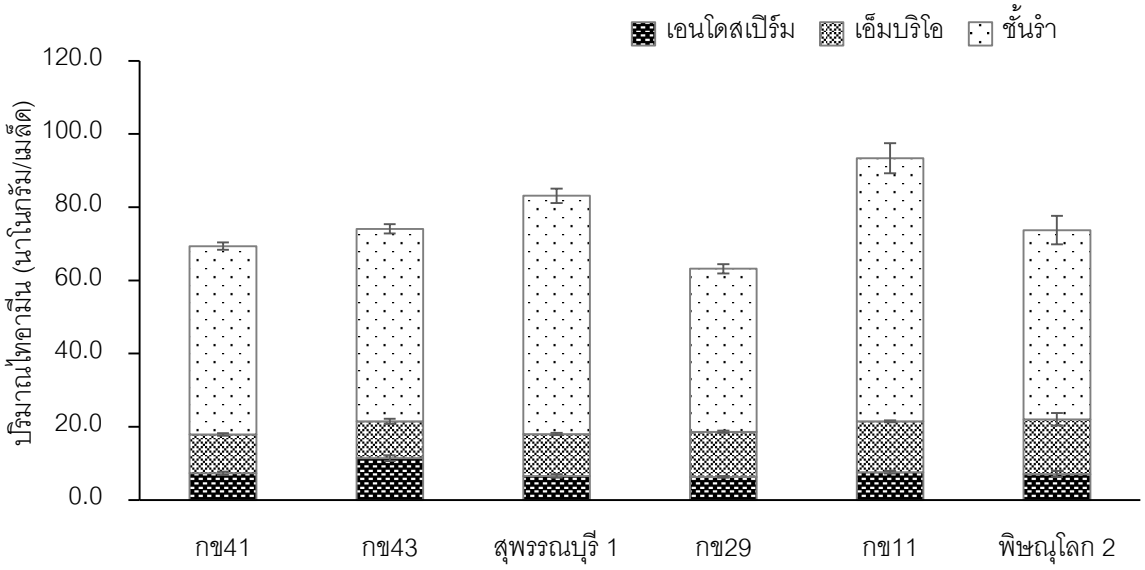
ตารางที่ 4-5 ปริมาณไทอามีนในเอนโดสเปิร์ม เอ็มบริโอและชั้นรำของข้าวกล้อง (mg/100g±SE)

พันธุ์	ข้าวกล้อง	เอนโดสเปิร์ม	เอ็มบริโอ[ns]	ชั้นรำ
กข41	0.394±0.018b	0.049±0.002b	2.373±0.095	1.242±0.097b
กข43	0.358±0.011bc	0.062±0.005a	1.986±0.073	1.101±0.094b
สุพรรณบุรี 1	0.443±0.007a	0.040±0.001c	2.221±0.079	1.623±0.148a
กข29	0.327±0.009c	0.039±0.001c	2.402±0.091	1.032±0.058b
กข11	0.474±0.016a	0.044±0.001bc	2.560±0.105	1.615±0.087a
พิษณุโลก 2	0.369±0.027bc	0.040±0.004c	2.642±0.293	1.140±0.141b

[1] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษร ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT

[ns] ข้อมูลในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่นัยสำคัญ 0.05

เมื่อคิดเป็นร้อยละในแต่ละส่วนของเมล็ดเปรียบเทียบกับไทอามีนในข้าวกล้อง พบว่าในหนึ่งเมล็ด บริเวณที่พบไทอามีนมากสุดคือส่วนของชั้นรำ มีไทอามีนอยู่ในช่วง 44.5-65.1 นาโนกรัม/เมล็ด คิดเป็นร้อยละ 70-82 ของไทอามีนในข้าวกล้อง ส่วนที่พบไทอามีนรองลงมา คือ ส่วนของเอ็มบริโอ และส่วนของเอนโดสเปิร์ม มีความผันแปรของไทอามีนอยู่ในช่วง 10.1-14.9 และ 6.3-11.4 นาโนกรัม/เมล็ด คิดเป็นร้อยละ 14-20 และ 8-15 ของไทอามีนในเมล็ดข้าวกล้องตามลำดับ (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-4 ปริมาณไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้องต่อหนึ่งเมล็ด (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE)

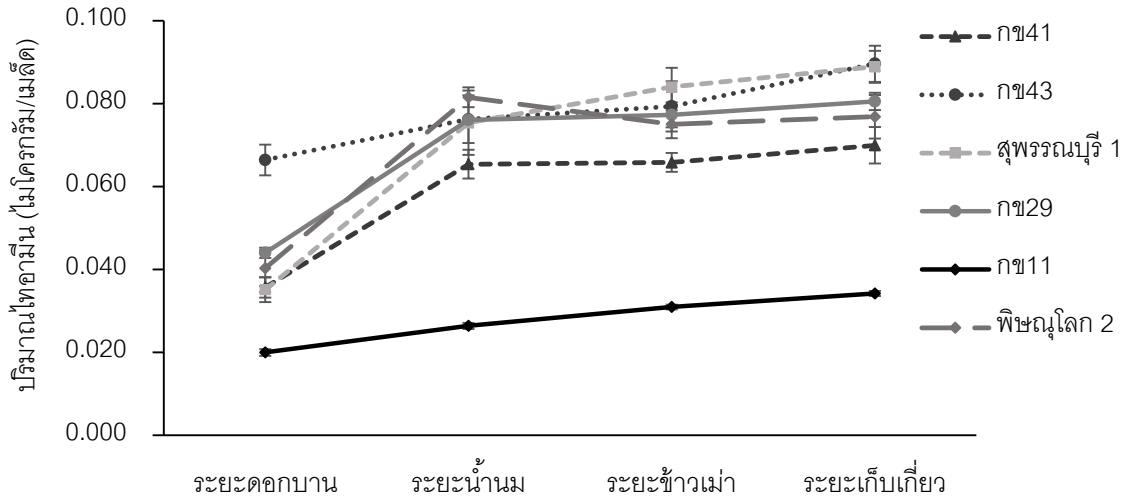
อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาจนถึงระยะเก็บเกี่ยวจะมีแนวโน้มการสะสมไทอามีนสูงขึ้น เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการงอกของเมล็ด ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาความผันแปรของปริมาณไทอามีนและอนุพันธ์ในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีนในการทดลองต่อไป

การหาปริมาณไทอามีน ไทอามีนโมโนฟอสเฟตและไทอามีนไดฟอสเฟตในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

การศึกษาปริมาณไทอามีนในเมล็ดข้าวทั้งสี่ระยะ ได้แก่ ระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยว พบว่าเมื่อเมล็ดมีการพัฒนามากขึ้นการสะสมไทอามีนในเมล็ดมี

แนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย โดยระยะเก็บเกี่ยวเป็นระยะที่พบปริมาณของไทอามีนมากที่สุดในข้าว 5 พันธุ์ คือ กข41 กข43 สุพรรณบุรี 1 กข29 และกข11 ขณะที่พันธุ์พิษณุโลก 2 มีปริมาณไทอามีนสูงที่สุดในระยะน้ำนม จากนั้นลดลงในระยะข้าวเม่าและคงที่จนกระทั่งถึงระยะเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 4-5)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่าข้าวพันธุ์กข41 สุพรรณบุรี 1 และพิษณุโลก 2 มีการสะสมของไทอามีนในระยะดอกบานแตกต่างจากระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยวที่นัยสำคัญ 0.05 (ตารางภาคผนวกที่ 22,23) ขณะที่พันธุ์กข43 กข29 และกข11 ทั้ง 4 ระยะมีการสะสมไทอามีนไม่แตกต่างกัน (ตารางภาคผนวกที่ 22) ในระยะดอกบานมีไทอามีนอยู่ในช่วง 0.020-0.066 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ระยะน้ำนมมีไทอามีนอยู่ในช่วง 0.026-0.082 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยวมีไทอามีนอยู่ในช่วง 0.031-0.084 และ 0.034-0.090 ไมโครกรัมต่อเมล็ดตามลำดับ ขณะที่ไทอามีนโมโนฟอสเฟตและไทอามีนไดฟอสเฟตมีปริมาณน้อยมากทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้

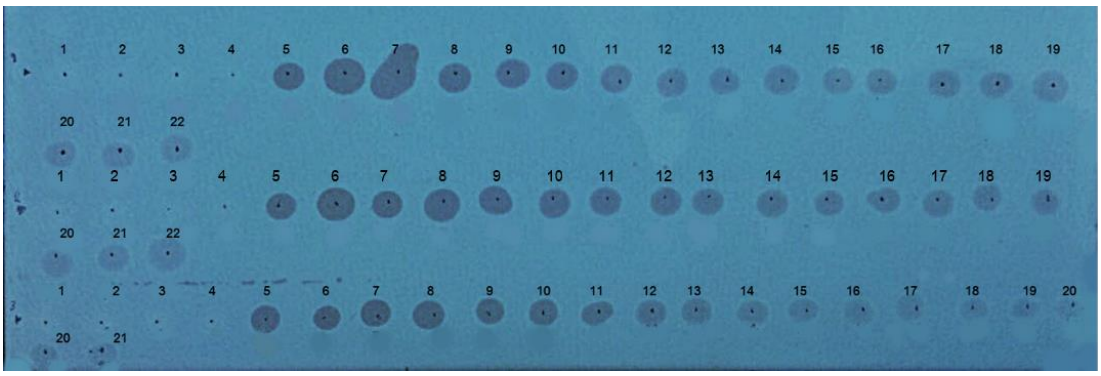


ภาพที่ 4-5 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไทอามีนระหว่างการพัฒนาของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์ (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE)

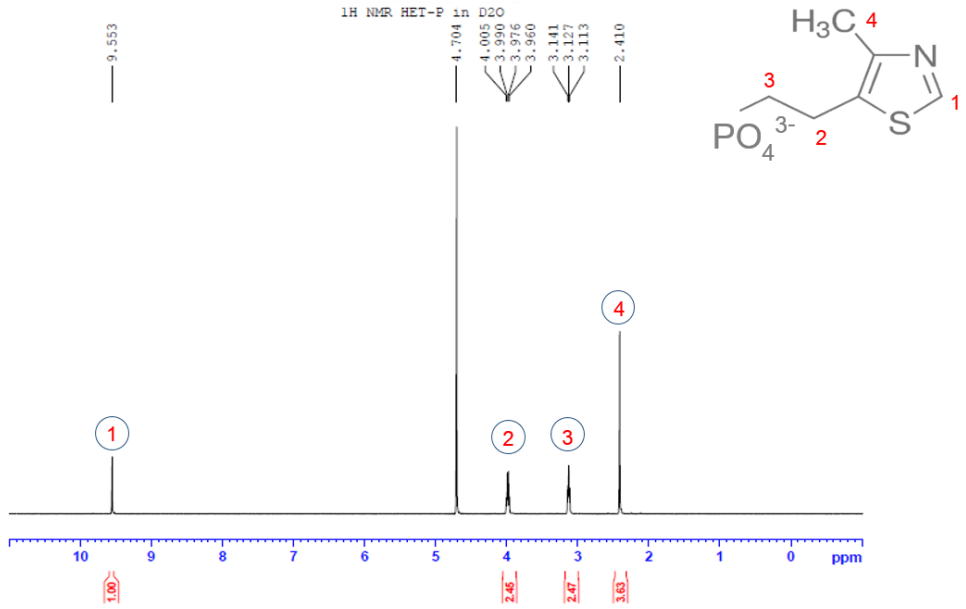
การทดลองที่ 4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีนในเมล็ดข้าวที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

การสังเคราะห์สารตั้งต้นไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต (HET-P)

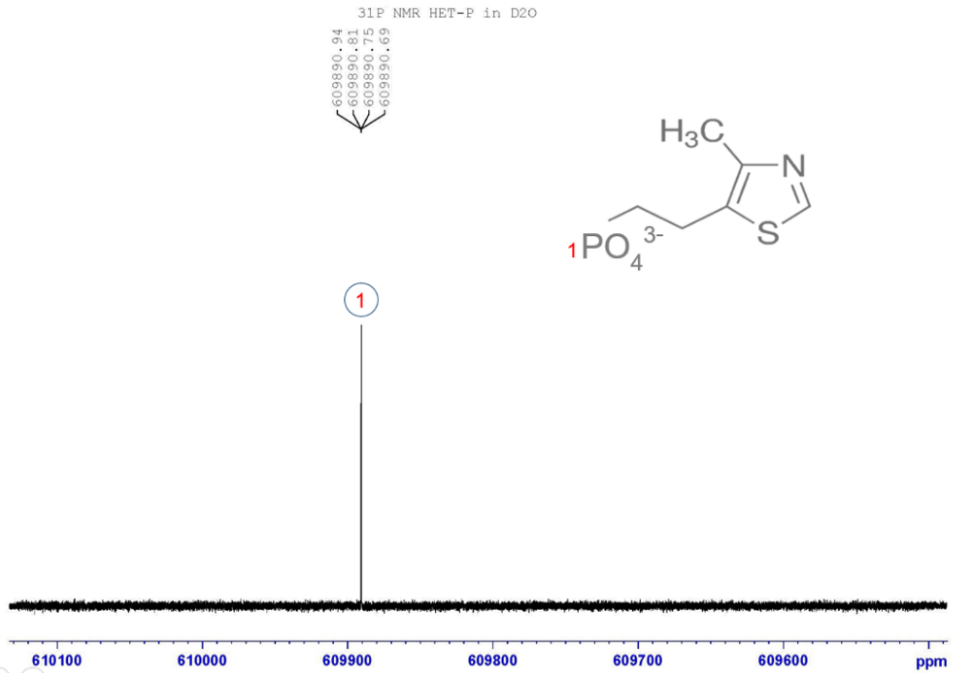
การสังเคราะห์ HET-P จากสารตั้งต้น 4-methyl-5-thiazoleethanol ด้วยปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชั่นกับกรดฟอสฟอริก เมื่อนำสารละลายที่สังเคราะห์ได้ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Dowex 50Wx8 hydrogen form เป็นเฟสคงที่และใช้น้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่มาตรวจสอบเบื้องต้นภายใต้รังสี UV พบว่าใน fraction ที่ 1-4 ไม่พบการเรืองแสง ขณะที่ fraction 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 โดยใช้ดิวเทอเรียมออกไซด์เป็นตัวทำละลาย ซึ่งได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-7 สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตอน (^{1}H-NMR) พบสเปกตรัมโปรตอน 4 จุดที่ตรงกับโครงสร้างของ HET-P ซึ่งจากการตรวจสอบสเปกตรัมฟอสเฟต (^{31}P NMR) พบสเปกตรัมของฟอสเฟต 1 จุด ที่ตรงกับโครงสร้างของ HET-P (ภาพที่ 4-8) และไม่ตรงกับสเปกตรัมฟอสเฟตของกรดฟอสฟอริกที่ใช้ในปฏิกิริยา (ภาพที่ 4-9) จากผลการวิเคราะห์ยืนยันได้ว่าเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชั่นระหว่าง 4-methyl-5-thiazoleethanol และกรดฟอสฟอริกได้เป็นผลิตภัณฑ์ HET-P เพื่อใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อไป



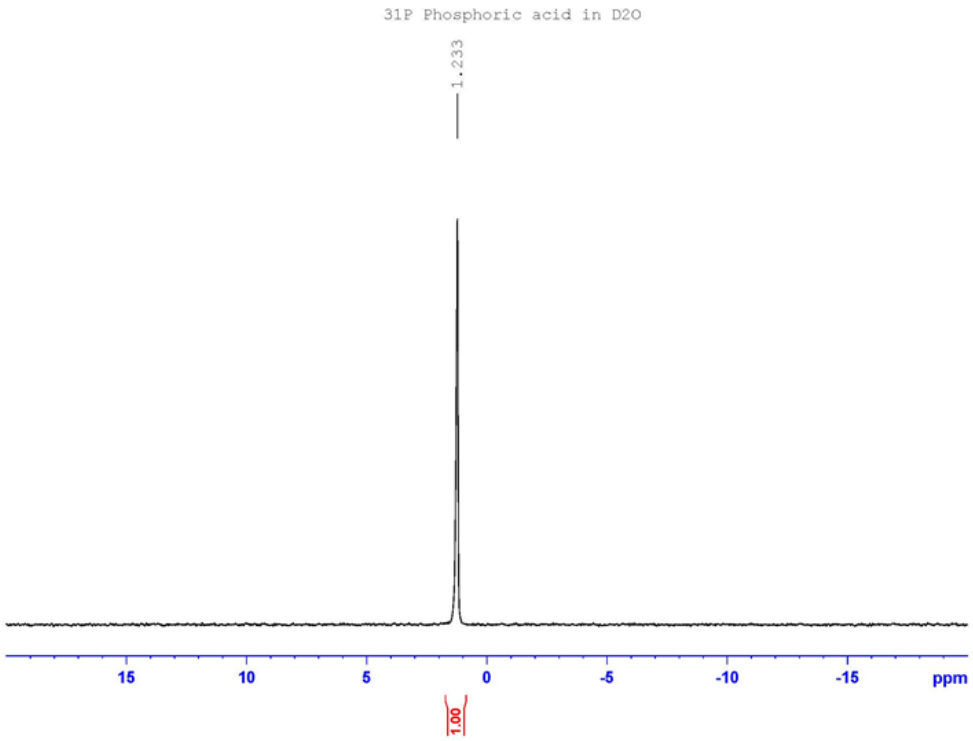
ภาพที่ 4-6 การตรวจสอบเบื้องต้นของสารละลายไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟตที่ผ่านคอลัมน์ภายใต้แสง UV (n=3)



ภาพที่ 4-7 ^{1}H-NMR ของไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต



ภาพที่ 4-8 ^{31}P-NMR ของไฮดรอกซีเอทิลไทแอโซลโมโนฟอสเฟต



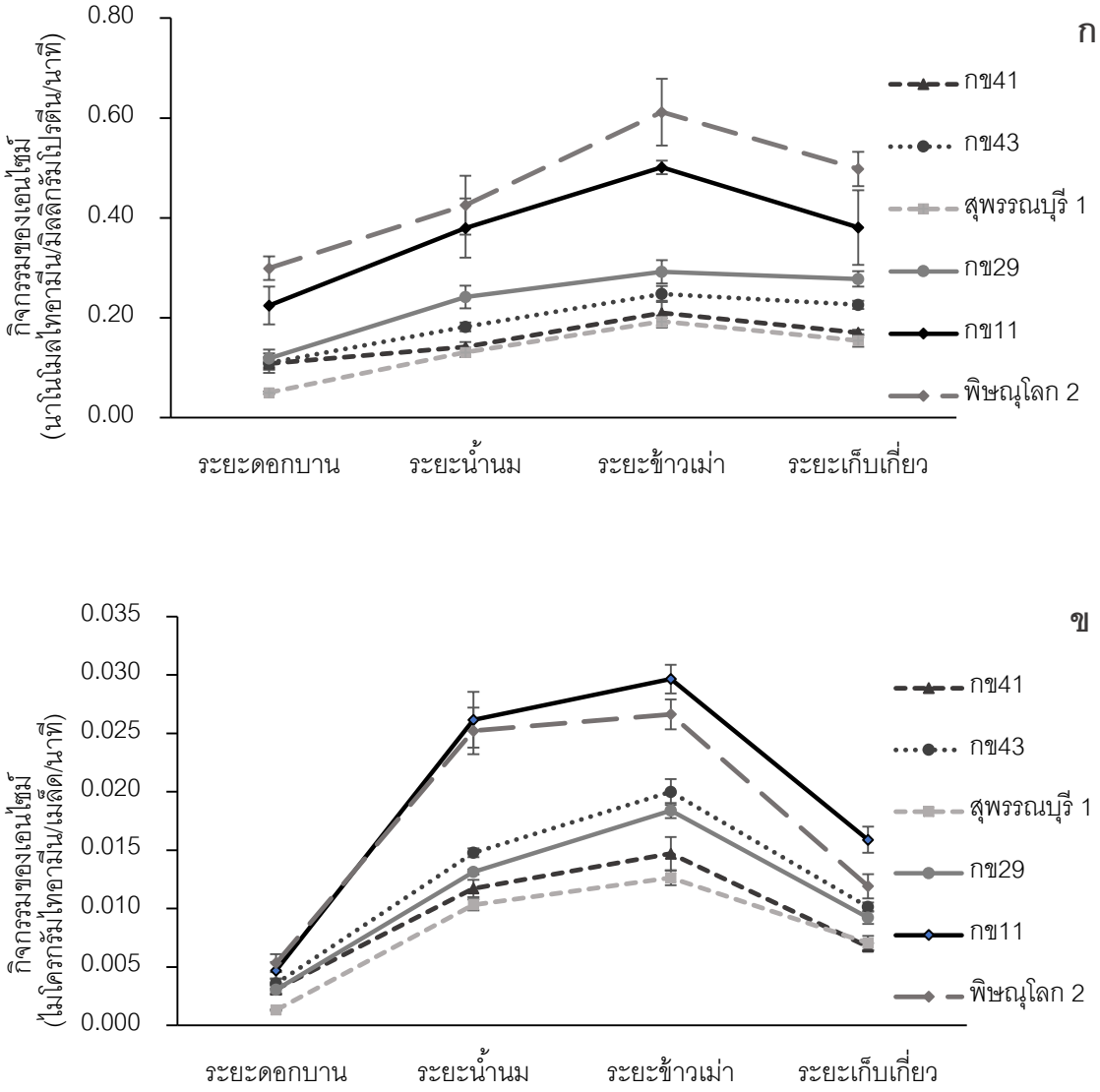
ภาพที่ 4-9 ^{31}P-NMR ของกรดฟอสฟอริก

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase

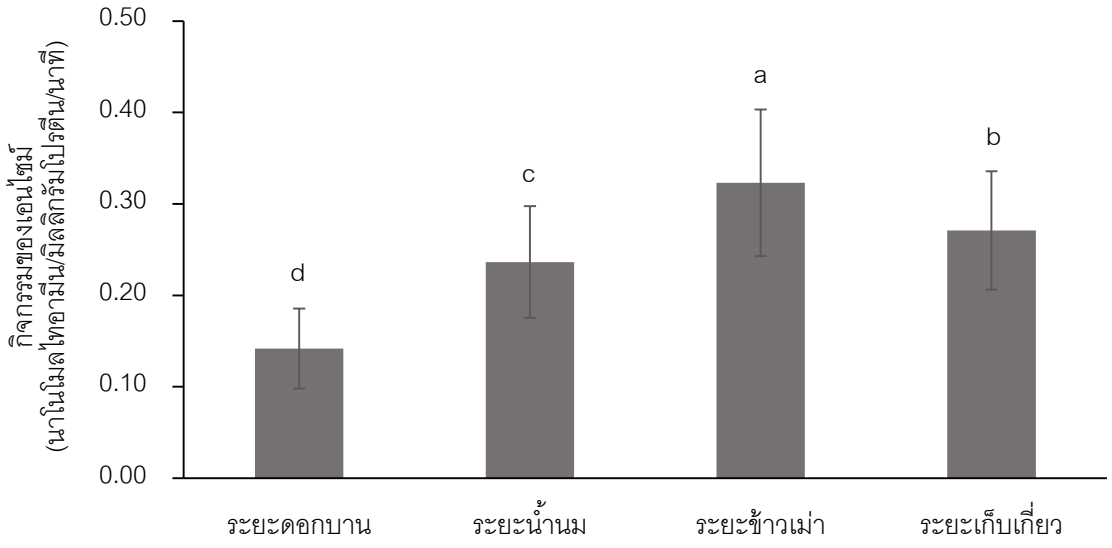
จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในเมล็ดข้าวที่ระยะการพัฒนาของเมล็ดทั้ง 4 ระยะ พบว่าเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาหลังจากดอกบานกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มสูงขึ้นและสูงที่สุดในระยะข้าวเม่าจากนั้นลดลงในระยะเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 4-10ก) ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อเมล็ดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนมและสูงที่สุดในระยะข้าวเม่าจากนั้นลดลงในระยะเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 4-10ข) ซึ่งมีแนวโน้มคล้ายคลึงกันในข้าวทั้ง 6 พันธุ์

จากการทดสอบทางสถิติพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในเมล็ดทั้ง 4 ระยะแตกต่างกันทางสถิติ ($p\text{-value} \leq 0.05$) ซึ่งแต่ละระยะมีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยในข้าว 6 พันธุ์ เท่ากับ 0.14, 0.24, 0.32 และ 0.28 นาโนโมลไทอามีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาทีตามลำดับ (ภาพที่ 4-11) (ตารางภาคผนวกที่ 24, 25) เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อเมล็ดในข้าว 6 พันธุ์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในเมล็ดทั้ง 4 ระยะอยู่ในช่วง 0.005-0.020, 0.039-0.093, 0.048-0.108 และ 0.027-0.060 นาโนโมลไทอามีนต่อเมล็ดต่อนาทีตามลำดับ ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase สูงที่สุดและพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase น้อยที่สุดเฉลี่ยใน 4 ระยะ

มีค่าเท่ากับ 0.132 และ 0.462 นาโนโมลไทอามีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 26)



ภาพที่ 4-10 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในแต่ละระยะการพัฒนาของข้าว 6 พันธุ์ (ก) กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อปริมาณโปรตีน (ข) กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อเมล็ด (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE)



ภาพที่ 4-11 กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase เฉลี่ยในข้าว 6 พันธุ์ที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE)

บทที่ 5
อภิปรายผลและสรุปผล

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาปริมาณไทอามีนรวมในข้าวกล้อง 30 พันธุ์ พบว่ามีปริมาณไทอามีนรวมอยู่ในช่วง 0.14-0.45 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม สอดคล้องกับรายงานของ Rujirapisit, Sangkaeo, and Leowsakulrat (2012) ศึกษาไทอามีนรวมในข้าวไทย 9 พันธุ์ (ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวหอมอุบล ข้าวสินเหล็ก ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวเล้าแตกและข้าวหอมกัญญา) พบความผันแปรอยู่ในช่วง 0.16-0.32 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมและการศึกษาไทอามีนรวมในข้าวอินเดีย 11 พันธุ์ ข้าวสาลี 49 พันธุ์ และข้าวทริทิเคลี 7 พันธุ์ พบความผันแปรในช่วง 0.12-0.19, 0.26-0.61 และ 0.02 มิลลิกรัม/ 100 กรัมตามลำดับ (Batifoulier, Verny, Chanliaud, Remesy, & Demigne, 2006; Prasad, Hymavathi, Babu, & Longvah, 2018; Witten & Aulrich, 2018) นอกจากนี้ Liu, Zheng, and Chen (2017) รายงานว่าข้าวอินดิกามีปริมาณไทอามีนรวมสูงกว่าข้าวจาโปนิก้าประมาณ 0.08 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ซึ่งปริมาณไทอามีนรวมในข้าวไทยทั้ง 30 พันธุ์ มีความผันแปรมากถึง 0.30 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม แสดงให้เห็นว่าการสร้างและสะสมไทอามีนเกิดจากพันธุกรรมที่ต่างกันของข้าวแต่ละพันธุ์ (Witten & Aulrich, 2018) โดยการศึกษาของ Shewry et al. (2011) ยืนยันว่าความผันแปรของไทอามีนรวม 27 เปอร์เซ็นต์เป็นผลมาจากพันธุกรรมที่ต่างกัน จากความแตกต่างของปริมาณไทอามีนรวมในข้าวแต่ละพันธุ์แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวระหว่างพันธุ์ที่มีลักษณะที่ดีกับพันธุ์ที่มีปริมาณไทอามีนมากเพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้มีการสร้างและสะสมไทอามีนเพิ่มขึ้น เช่น ถ้าใช้แหล่งพันธุกรรมจากข้าวพันธุ์กข41 มาปรับปรุงการสร้างและการสะสมไทอามีนรวมของข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 อาจสามารถทำให้ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 มีปริมาณไทอามีนสูงขึ้นได้ถึง 3 เท่า นอกจากนี้ความแตกต่างของไทอามีนในข้าวแต่ละพันธุ์ยังแสดงให้เห็นว่า หากต้องการบริโภคข้าวกล้องเพื่อให้ได้รับไทอามีนในปริมาณที่ควรได้รับต่อวันคือ 1-1.5 มิลลิกรัม ต้องบริโภคข้าวกล้องพันธุ์พิษณุโลก 2 ถึง 1000 กรัม ขณะที่พันธุ์กข41 บริโภคเพียง 300 กรัมเพื่อให้ได้ปริมาณไทอามีนรวมที่เท่ากันขณะที่ปริมาณแป้งที่ได้รับต่างกันอย่างมาก ดังนั้นหากสามารถเพิ่มไทอามีนในข้าวให้มีปริมาณที่มากขึ้นไม่เพียงแต่นำไปสู่การพัฒนาพันธุ์ข้าวไทยที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่โดดเด่นยังเป็นอีกหนึ่งทางเลือกให้กับผู้บริโภคที่ใส่ใจในสุขภาพและผู้ป่วยที่ต้องการควบคุมการบริโภคแป้งให้น้อยลงได้ นอกจากนี้พบว่าความผันแปรของไทอามีนเกิดจากชนิดของธัญพืชที่ต่างกัน เช่น ถั่ว

เหลือง เมล็ดทานตะวันและงา มีไทอามีนรวมเท่ากับ 0.912, 1.049 และ 0.716 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ (Lebiedziǹska & Szefer, 2006) ซึ่งในข้าวพบเพียงแค่ 0.274 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ชี้ให้เห็นว่าในธรรมชาติธัญพืชชนิดต่าง ๆ มีความสามารถสร้างและสะสมไทอามีนในเมล็ดได้แตกต่างกัน อาจเป็นเพราะกิจกรรมของเอนไซม์และองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์แตกต่างกัน จากข้อมูลดังกล่าวเป็นไปได้ว่าปริมาณไทอามีนในเมล็ดข้าวอาจสามารถทำให้เพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงกับธัญพืชชนิดอื่น ๆ ได้

ไม่เพียงแต่ความผันแปรของไทอามีนที่อาจเกิดจากพันธุกรรมที่ต่างกัน Wang et al. (2011) รายงานว่าลักษณะทางกายภาพของเมล็ดข้าวมีผลต่อความผันแปรของคุณค่าทางอาหารในเมล็ด ซึ่งจากการศึกษาโครงสร้างของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์ที่คัดเลือกจากพันธุ์ที่มีปริมาณไทอามีนรวมมากที่สุด ปานกลางและน้อยที่สุดอย่างละ 2 พันธุ์ พบว่าเมล็ดข้าวกล้องทั้ง 6 พันธุ์มีปริมาตรเมล็ดข้าวกล้อง ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม และปริมาตรชั้นรำแตกต่างกันคืออยู่ในช่วง 12.1-15.8, 10.7-14.5 และ 1.19-1.73 ลูกบาศก์มิลลิเมตรตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wang et al. (2011) รายงานว่าข้าวกล้องกลุ่มอินดิกามีปริมาตรเมล็ดประมาณ 14.7-15.9 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และการศึกษาของ Liu and Ng (2016) รายงานว่าข้าวสาลี 3 พันธุ์มีความหนาชั้นรำแตกต่างกันโดยมีความหนาประมาณ 0.05-0.06 มิลลิเมตร ใกล้เคียงกับความหนาชั้นรำในข้าวไทย 6 พันธุ์ มีความหนาอยู่ในช่วง 0.04-0.05 มิลลิเมตร Peyron, Mabille, Devaux, and Autran (2003) รายงานว่าข้าวสาลี 4 พันธุ์มีความผันแปรของความหนาเนื้อเยื่อชั้นแอลิวโรนประมาณ 0.01 มิลลิเมตร เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพของเมล็ดกับปริมาณไทอามีนรวมพบว่า ปริมาตรชั้นรำและความหนาชั้นรำมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณไทอามีนรวม (r = 0.503 และ 0.680 ตามลำดับ) คือเมื่อปริมาตรและความหนาชั้นรำมากขึ้น ปริมาณไทอามีนรวมจะเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากชั้นรำประกอบด้วยส่วนของเปลือกเมล็ด (caryopsis coat) และเนื้อเยื่อแอลิวโรน (aleurone layer) ซึ่งมีรายงานว่าไทอามีนจะสะสมอยู่มากบริเวณเนื้อเยื่อแอลิวโรนและเอ็มบริโอ (Cho & Lim, 2016; Eijkman & Grijns, 2012; Liu et al., 2017) แสดงให้เห็นว่าความผันแปรของไทอามีนรวมอาจเกิดจากลักษณะทางกายภาพของเมล็ดที่ต่างกัน เนื่องจากข้าวกล้องแต่ละพันธุ์มีความหนาชั้นรำ ปริมาตรของชั้นรำ ปริมาตรเอนโดสเปิร์มและปริมาตรเมล็ดแตกต่างกัน จึงทำการศึกษาไทอามีนในแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวกล้องเพื่อวิเคราะห์ความผันแปรของไทอามีนในแต่ละส่วน ประกอบด้วยส่วนของเอนโดสเปิร์ม ชั้นรำ และเอ็มบริโอ พบว่าในหนึ่งเมล็ดบริเวณที่พบไทอามีนมากที่สุดคือส่วนของชั้นรำ มีไทอามีนอยู่ในช่วง 44.5-65.1 นาโนกรัม/เมล็ด คิดเป็นร้อยละ 70-82 ของไทอามีนในข้าวกล้อง สอดคล้องกับรายงานของ Kyritsi, Tzia, and

Karathanos (2011) รายงานว่าข้าวที่ผ่านการขัดเอาส่วนของชั้นรำออกทำให้สูญเสียไทอามีนประมาณ 68-82 เปอร์เซ็นต์ของไทอามีนที่พบในข้าวกล้อง ส่วนที่พบไทอามีนรองลงมา คือส่วนของเอ็มบริโอและส่วนของเอนโดสเปิร์ม มีความผันแปรของไทอามีนอยู่ในช่วง 10.1-14.9 และ 6.3-11.4 นาโนกรัม/เมล็ด คิดเป็นร้อยละ 14-20 และ 8-15 ของไทอามีนในเมล็ดข้าวกล้องตามลำดับ จากรายงานของ Dong, Thomas, Ronald, and Goyer (2016) ศึกษาการแสดงออกของยีน 13 ยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไทอามีนในเอนโดสเปิร์มเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอและใบซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสังเคราะห์ไทอามีนมาก รายงานว่าในเอนโดสเปิร์มที่พัฒนาหลังจากดอกบาน 6 วัน มีการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไทอามีนเช่นเดียวกับในเอ็มบริโอแต่เป็นไปได้ว่าในเอนโดสเปิร์มอาจมีปริมาณสารตั้งต้นน้อยหรือโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ไม่ผ่านกระบวนการดัดแปลงโครงสร้างเพื่อให้พร้อมทำงาน ทำให้เอนโดสเปิร์มของข้าวมีปริมาณไทอามีนน้อยกว่าในส่วนอื่น ๆ โดยจากการทดสอบทางสถิติพบว่าบริเวณเอ็มบริโอทั้ง 6 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนไม่แตกต่างกันขณะที่ชั้นรำและเอนโดสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นความผันแปรของไทอามีนในเมล็ดข้าวกล้องเกิดจากความแตกต่างบริเวณชั้นรำและเอนโดสเปิร์มของข้าวแต่ละพันธุ์ ซึ่งจากการศึกษาปริมาณไทอามีนในข้าวกล้องมีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.394 มิลลิกรัม/ 100 กรัมและในเอนโดสเปิร์มพบเพียงแค่ 0.045 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Li et al. (2007) Babu et al. (2009) และ Kyritsi et al. (2011) ยืนยันว่าปริมาณไทอามีนที่ต่างกันของข้าวกล้องขึ้นกับความผันแปรของไทอามีนบริเวณชั้นรำเป็นหลัก ดังนั้นหากสามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มความหนาและปริมาตรของชั้นรำ ซึ่งมีรายงานว่าความหนาของชั้นรำและขนาดของเอนโดสเปิร์มขึ้นกับสายพันธุ์และสภาพแวดล้อมที่ปลูก (Liu & Ng, 2016; Peyron et al., 2003) อาจทำให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีปริมาณไทอามีนสูงขึ้นเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณไทอามีนในเมล็ดข้าวให้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามจากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไทอามีนกับความหนาและปริมาตรชั้นรำซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระดับปานกลาง ชี้ให้เห็นว่านอกจากปริมาณไทอามีนจะขึ้นกับความหนาและปริมาตรของชั้นรำแล้วยังอาจเกิดได้จากปัจจัยอื่น ๆ เช่น พันธุ์ที่มีไทอามีนสูงอาจมีอัตราการเกิดเมตาบอลิซึมมากกว่าจึงจำเป็นต้องสะสมไทอามีนที่ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์มากกว่าให้เพียงพอต่อความต้องการในวิถีเมตาบอลิซึมเพื่อสร้างพลังงานหรือมีปริมาณโปรตีนที่จำเพาะกับไทอามีน (thiamin-binding protein) และความสามารถในการจับของไทอามีนกับโปรตีน (thiamine-binding capacity) มากกว่าจึงสามารถจับและสะสมไทอามีนได้มากกว่า ซึ่งมีหลายงานวิจัยรายงานว่าเมล็ดพืชแต่ละชนิดมีกิจกรรมการจับและความสามารถในการจับของไทอามีนกับ thiamin-binding protein แตกต่างกัน (Adamek-

Świerczyńska & Kozik, 2002; Adamek-Świerczyńska, Rąpała-Kozik, & Kozik, 2000; Mitsunaga, Matsada, Shimizu, & Iwashima, 1986; Mitsunaga, Shimizu, & Iwashima, 1986; Nishimura, Uehara, Sempuku, & Iwashima, 1984; Shimizu, Yoshida, Toda, Iwashima, & Mitsunaga, 1996; Watanabe et al., 1998) อย่างไรก็ตามยังไม่พบการรายงานว่าสายพันธุ์ของพืชที่ต่างกันมีผลต่อความผันแปรของปริมาณ thiamin-binding protein หรือไม่

นอกจากนี้ Kim et al. (2014) รายงานว่าไม่เพียงแต่พันธุกรรมที่ต่างกันระยะการพัฒนาของเมล็ดที่ต่างกันยังส่งผลต่อความผันแปรของไทอามีนด้วย ซึ่งการศึกษาปริมาณไทอามีนในเมล็ดข้าวที่ระยะการพัฒนาต่างกัน ได้แก่ ระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยว พบว่าเมื่อเมล็ดมีการพัฒนามากขึ้นการสะสมไทอามีนในเมล็ดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าระยะดอกบานมีปริมาณไทอามีนน้อยที่สุด หลังจากนั้นจึงมีการสร้างและสะสมปริมาณไทอามีนเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนมและจะค่อนข้างคงที่จนถึงระยะเก็บเกี่ยวซึ่งเป็นระยะที่พบปริมาณของไทอามีนมากที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ Shimizu et al. (1990) ที่ศึกษาการสร้างของไทอามีนในเมล็ดข้าวพันธุ์ Nihonbare ช่วงการพัฒนาหลังจากดอกบาน รายงานว่าปริมาณไทอามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วประมาณ 50 นาโนกรัม/เมล็ด ตั้งแต่ 10 วันหลังจากดอกบานจนถึง 30 วันหลังดอกบานจากนั้นจะเริ่มคงที่จนกระทั่งถึง 50 วันหลังจากดอกบาน และ Lisiewska, Korus, and Kmiecik (2003) รายงานว่าไทอามีนในเมล็ดต้นแกรสพี (*Lathyrus sativus* L.) เพิ่มขึ้น 44 เปอร์เซ็นต์เมื่อเมล็ดมีการพัฒนาใน 5 ระยะเช่นเดียวกับการศึกษาในข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวไรน์ ข้าวทริทิเคลี ข้าวสาลี และเมล็ดงา พบว่าไทอามีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาในช่วงต้นและเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในช่วงปลายของการพัฒนาของเมล็ด ขณะที่ปริมาณไทอามีนโมโนฟอสเฟสและไทอามีนไดฟอสเฟสซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไทอามีนมีแนวโน้มลดลง (Buchholz, Drotleff, & Ternes, 2012; Watanabe, Takahashi, Ampo, & Mitsunaga, 2003) ซึ่งการศึกษาในเมล็ดข้าวพบว่าในระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยวปริมาณไทอามีนไม่มีความแตกต่างกันเมื่อทดสอบทางสถิติ โดยพบความผันแปรของไทอามีนในระยะดอกบานของข้าวทั้ง 6 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนอยู่ในช่วง 0.020-0.066 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ระยะน้ำนมมีไทอามีนอยู่ในช่วง 0.026-0.082 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยวมีไทอามีนอยู่ในช่วง 0.031-0.084 และ 0.034-0.090 ไมโครกรัมต่อเมล็ดตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปริมาณไทอามีนในแต่ละระยะมีความผันแปรค่อนข้างสูงในพันธุ์ข้าวที่ต่างกัน ซึ่งอัตราการเพิ่มขึ้นของไทอามีนจากระยะดอกบานถึงระยะเก็บเกี่ยวเพิ่มขึ้นประมาณ 0.033 ไมโครกรัมต่อเมล็ด ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Shimizu et al. (1990) รายงาน

ว่าเมล็ดข้าวที่พัฒนา 50 วันหลังจากดอกบานมีไทอามีนเพิ่มขึ้นประมาณ 0.060 ไมโครกรัมต่อเมล็ดทั้งนี้อาจเป็นเพราะอายุเก็บเกี่ยวต่างกันมาก เนื่องจากในการทดลองนี้เก็บเกี่ยวที่อายุประมาณ 30 วันหลังจากดอกบานและ Watanabe et al. (2004) รายงานว่าในข้าวสาลีมีไทอามีนเพิ่มขึ้นประมาณ 0.028 ไมโครกรัมต่อเมล็ดที่ 6 สัปดาห์หลังจากดอกบาน

นอกจากนี้พบว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีอัตราการสร้างไทอามีนในเมล็ดไม่เท่ากัน ส่งผลให้ปริมาณไทอามีนในระยะเก็บเกี่ยวของข้าวทั้ง 6 พันธุ์แตกต่างกัน เป็นไปได้ว่าข้าวพันธุ์ที่มีอัตราการสังเคราะห์ไทอามีนสูง เป็นเพราะความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีน เช่น HET-P synthase, HMP kinase และ thiamine-phosphate pyrophosphorylase (Phraprasert, 2015) สามารถทำงานได้มากกว่าพันธุ์ที่มีอัตราการสร้างไทอามีนที่ต่ำกว่า Rapala-Kozik, Olczak, Ostrowska, Starosta, and Kozik (2007) รายงานว่าโปรตีน THI3 ในข้าวโพดมีคุณสมบัติของสองเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีน คือ เอนไซม์ HMP kinase ทางด้านปลาย N และเอนไซม์ TMP-PPase ทางด้านปลาย C สามารถสังเคราะห์ไทอามีนโมโนฟอสเฟสได้จากสารตั้งต้น HMP และ HET-P เมื่อมีแมกนีเซียมเป็นโคแฟกเตอร์เช่นเดียวกับโปรตีน BTH1 ในผักกาด (Kim et al., 1998) จากการสืบค้นในฐานข้อมูลโปรตีนพบว่าโปรตีน THI3 ในข้าวโพดมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีนในข้าว 77 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมากกว่าในถั่ว *Medicago truncatula* ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีน THI3 ในข้าวโพดเพียง 63 เปอร์เซนต์ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าโปรตีนที่พบใน ถั่ว *Medicago truncatula* มีคุณสมบัติเป็น bifunctional protein จึงทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในเมล็ดข้าวที่ระยะการพัฒนา 4 ระยะ พบว่าระยะการพัฒนาของเมล็ดทั้ง 4 ระยะมีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase แตกต่างกัน โดยเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาหลังจากดอกบานกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อเมล็ดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนมและสูงที่สุดในระยะข้าวเม่าจากนั้นลดลงในระยะเก็บเกี่ยว (0.004, 0.017, 0.020 และ 0.010 ไมโครกรัมไทอามีนต่อเมล็ดต่อนาที ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาในข้าวแต่ละพันธุ์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase แตกต่างกัน พันธุ์พิษณุโลก 2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase สูงที่สุดขณะที่พันธุ์สุพรรณบุรี 1 กิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุด (0.462 และ 0.132 นาโนโมลไทอามีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาทีตามลำดับ) ซึ่งข้าวทั้ง 6 พันธุ์มีกิจกรรมเฉลี่ยประมาณ 0.26 นาโนโมลไทอามีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ใกล้เคียงกับรายงานในต้นกล้าข้าวโพดมีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase เท่ากับ 0.22 นาโนโมลไทอามีนมอนอฟอสเฟตต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที (Rapala-Kozik et al., 2007) Belanger, Leustek, Chu, and Kriz (1995) และ Phraprasert

(2015) กล่าวว่าการสังเคราะห์ไทอามีนจะเกิดมากในช่วงที่เมล็ดมีสีเขียว เนื่องจากพบว่ากระบวนการสังเคราะห์ไทอามีนเกิดขึ้นในพลาสติด สังเกตได้ว่าในระยะน้ำนมและข้าวเม่ามีกิจกรรมของเอนไซม์และการสะสมไทอามีนสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเมล็ดต้องเร่งสร้างและสะสมไทอามีนให้เพียงพอ เมื่อเข้าสู่ระยะเก็บเกี่ยวซึ่งเมล็ดกำลังเข้าสู่ระยะพัก กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์จากระยะข้าวเม่าขณะที่ปริมาณไทอามีนในระยะเก็บเกี่ยวสูงที่สุด เนื่องจากไทอามีนเป็นรูปที่สะสมโดยจับอยู่กับ thiamin-binding protein มีรายงานว่าในข้าวกิจกรรมการจับของไทอามีนจะเพิ่มขึ้นหลังจากดอกบาน 10 วันและคงที่หลังจากดอกบาน 30 วัน โดยการเพิ่มขึ้นของไทอามีนและการเพิ่มขึ้นของโปรตีนเป็นไปในทางเดียวกัน (Shimizu, Mitsunaga, Inaba, Yoshida, & Iwashima, 1990) การศึกษาคุณสมบัติของ thiamin-binding protein ในชั้นรำของข้าวและเมล็ดบักวีทระบุว่า thiamin-binding protein จำเพาะกับไทอามีนเท่านั้น ไม่สามารถจับกับไทอามีนมอนอฟอสเฟตและไทอามีนไดฟอสเฟตได้ (Mitsunaga, Matsada, et al., 1986; Nishimura et al., 1984) จึงทำให้ในระยะเก็บเกี่ยวพืชจะเปลี่ยนอนุพันธ์ของไทอามีนเป็นไทอามีนสำหรับจัดเก็บในระยะพักตัวและเตรียมพร้อมสำหรับการงอกของเมล็ด (Ampo et al., 2007; Watanabe et al., 2004) เมื่อเกิดการดูดน้ำของเมล็ดไทอามีนจะถูกเปลี่ยนเป็นไทอามีนไดฟอสเฟตมีบทบาทสำคัญในวิถีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตเพื่อสร้างพลังงาน สังเคราะห์น้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรมรวมถึงการสร้างสารตัวกลางในวิถีไกลโคไลซีส (Rapala-Kozik, 2011) Golda, Szyniarowski, Ostrowska, Kozik, and Rapala-Kozik (2004) พบว่าในธัญพืชปริมาณไทอามีนจะเริ่มลดลงเมื่อเมล็ดงอก 3 วันและในพืชตระกูลถั่วจะเริ่มลดลงเมื่อเมล็ดงอก 6 วัน ขณะที่ปริมาณไทอามีนไดฟอสเฟตเพิ่มสูงขึ้น Rapala-Kozik, Golda, and Kujda (2009) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ TMP-PPase และ TPK สูงขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเมล็ดข้าวโพดดูดน้ำได้ 5 วัน จากข้อมูลดังกล่าวเห็นถึงความผันแปรของไทอามีนและกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าวเป็นไปได้ว่าหากสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ให้สูงขึ้น อาจมีโอกาสทำให้ปริมาณไทอามีนที่สะสมในเมล็ดสูงขึ้นได้ นอกจากนี้ความผันแปรของไทอามีนยังเกิดได้จากปัจจัยอื่น ๆ เช่น สภาพแวดล้อมในการปลูก (Goyer & Haynes, 2011; Witten & Aulrich, 2018) และความเครียดจากปัจจัยต่าง ๆ (Rapala-Kozik, Kowalska, & Ostrowska, 2008) ดังนั้นการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ อาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำไปสู่ความก้าวหน้าในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณไทอามีนในเมล็ดเพิ่มขึ้นเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับข้าวไทยต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาปริมาณไทอามีนรวมในเมล็ดข้าวไทย 30 พันธุ์ มีปริมาณไทอามีนรวมแตกต่างกัน พบความผันแปรของไทอามีนรวมอยู่ในช่วง 0.16-0.32 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

2. ข้าว 6 พันธุ์มีโครงสร้างของเมล็ด ได้แก่ ปริมาตรเมล็ด ปริมาตรเอ็นโดสเปิร์ม ปริมาตรชั้นรำ ความหนาชั้นรำแตกต่างกัน ซึ่งปริมาตรและความหนาชั้นรำมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการสะสมของไทอามีนรวม

3. เมื่อเมล็ดมีการพัฒนาที่ระยะต่างกันมีการสะสมไทอามีนในเมล็ดแตกต่างกัน โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นชัดเจนระยะน้ำนมและสูงที่สุดในระยะเก็บเกี่ยว ซึ่งพบข้าวทั้ง 6 พันธุ์มีการสะสมไทอามีนในแต่ละระยะแตกต่างกัน

4. เมล็ดข้าวที่ระยะการพัฒนาของเมล็ดแตกต่างกันมีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase แตกต่างกัน โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนมและสูงที่สุดในระยะข้าวเม่าจากนั้นลดลงในระยะเก็บเกี่ยวคล้ายคลึงกันในข้าวทั้ง 6 พันธุ์ ซึ่งข้าวทั้ง 6 พันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase แตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีนในเมล็ด
2. ควรศึกษาความผันแปรของปริมาณโปรตีนที่จำเพาะกับไทอามีนในข้าวแต่ละพันธุ์
3. ควรศึกษาความผันแปรของไทอามีนจากปัจจัยความเครียดต่าง ๆ

บรรณานุกรม

จุรีรัตน์ ดาดวง. (2555). *วิตามิน (*Vitamin). ขอนแก่น: คลังนานาวิทยา.

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

นิลวรรณ เพชระบูรนิล, จตุรพร พรศิลปทิพย์, รพีพรรณ เกตุศิระ, และปรีดา ยังสุขสถาพร. (2548). *Orice*. กรุงเทพฯ: แท่นทองชัยพัฒน์.

บุญหงษ์ จงคิด. (2547). *ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

Adamek-Świerczyńska, S., & Kozik, A. (2002). Multiple thiamine-binding proteins of legume seeds. Thiamine-binding vicilin of Vicia faba versus thiamine-binding albumin of Pisum sativum. *Plant Physiology and Biochemistry, 40*, 735-741.

Adamek-Świerczyńska, S., Rąpała-Kozik, M., & Kozik, A. (2000). Purification and Preliminary Characterisation of a Thiamine-binding Protein from Maize Seeds. *Journal of Plant Physiology, 156*(5-6), 635-639.

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.

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.

Babu, D. P., Subhasree, R. S., Bhakyaraj, R., & Vidhyalakshmi, R. (2009). Brown Rice-Beyond the Color Reviving a Lost Health Food - A Review. *American-Eurasian Journal of Agronomy,* 2(2), 67-72.

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.

Bechtel, D. B., & Pomeranz, Y. (1978). Ultrastructure of the Mature Ungerminated Rice (Oryza sativa) Caryopsis. The Starchy Endosperm. *American Journal of*

Botany, 65(6), 684-691.

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 Molecular Biology, 29*(4), 809-821.

Brody, T. (1999). *Nutritional Biochemistry* (2nd ed.). California: Academic Press.

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* (4th 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.

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

Dalen, G. V. (2005). Characterisation of rice using flatbed scanning and image analysis. In A. P. Riley (Ed.), *Food Policy, Control and Research* (pp. 149-186). New York: Nova scinece.

Dong, W., Thomas, N., Ronald, P. C., & Goyer, A. (2016). Overexpression of Thiamin Biosynthesis Genes in Rice Increases Leaf and Unpolished Grain Thiamin Content But Not Resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae. *Frontiers in Plant Science, 7*, 1-11.

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

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.

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

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.

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, G. P., Lee, J., Ahn, K. G., Hwang, Y. S., Choi, Y., Chun, J., Choung, M. G. (2014). Differential responses of B vitamins in black soybean seeds. *Food Chemistry, 153*, 101-108.

Kim, Y. S., Nosaka, K., Downs, D. M., Kwak, J. M., Park, D., Kyung, C., & 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.

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.

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

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), 420-424.

Lisiewska, Z., Korus, A., & Kmiecik, W. (2003). Changes in chemical composition during development of grass pea (Lathyrus sativus L.) seeds. *Nahrung, 47*(6), 391-396.

Liu, K.-l., 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. *LWT - Food Science and Technology, 82*, 429-436.

Liu, Y., & Ng, P. K. (2016). Relationship between bran characteristics and bran starch of

selected soft wheats grown in Michigan. *Food Chemistry, 197*, 427-435.

Mitsunaga, T., Matsada, M., Shimizu, M., & Iwashima, A. (1986). Isolation and properties of a thiamine-binding protein from buckwheat seed. *Cereal Chemistry, 63*(4), 332-335.

Mitsunaga, T., Shimizu, M., & Iwashima, A. (1986). Occurrence of Thiamine-binding Proteins in Plant Seeds. *Journal of Plant Physiology, 124*, 177-180.

Moldenhauer, K., Charles, E., Wilson, J., Counce, P., & Hardke, J. (2001). Rice Growth and Development. In N. A. Slaton, L. B. Ford, J. L. Bernhardt, R. D. Cartwright, D. Gardisser & J. Gibbons (Eds.), *Rice Production Handbook* (pp. 9-20). Arkansas: Little Rock.

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.

Nishimura, H., Uehara, Y., Sempuku, K., & Iwashima, A. (1984). Purification and some properties of thiamine-binding protein from rice bran. *Nutritional Science and Vitaminology, 30*, 1-10.

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.

Peyron, S., Mabille, F., Devaux, M. F., & Autran, J. C. (2003). Influence of Structural Characteristics of Aleurone Layer on Milling Behavior of Durum Wheat (Triticum durum Desf.). *Cereal Chemistry, 80*(1), 62-67.

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

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.

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, 58*, 37-91.

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.

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.

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.

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*, 1-14.

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

Shewry, P. R., Van Schaik, F., Ravel, C., Charmet, G., Rakszegi, M., Bedo, Z., & Ward, J. L. (2011). Genotype and environment effects on the contents of vitamins B1, B2, B3, and B6 in wheat grain. *J Agric Food Chem, 59*(19), 10564-10571.

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.

Shimizu, M., Yoshida, T., Toda, T., Iwashima, A., & Mitsunaga, T. (1996). Isolation of a Thiamine-binding Protein from Rice Germ and Distribution of Similar Proteins. *Biosci Biotechnol Biochem, 60*(3), 453-457.

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.

Tunc-Ozdemir, M., Miller, G., Song, L., Kim, J., Sodek, A., Koussevitzky, S., Shintani, D. (2009). Thiamin Confers Enhanced Tolerance to Oxidative Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology, 151*(1), 421-432.

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

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.

Wang, K. M., Wu, J. G., Li, G., Zhang, D. P., Yang, Z. W., & Shi, C. H. (2011). Distribution of phytic acid and mineral elements in three indica rice (Oryza sativa L.) cultivars. *Journal of Cereal Science, 54*(1), 116-121.

Watanabe, K., Chikushi, K., Adachi, T., Shimizu, M., Yoshida, T., & Mitsunaga, T. (1998). Thiamin-binding protein from sunflower seeds. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 44*(5), 665-672.

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 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.

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.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. แอมโมเนียบัฟเฟอร์ (NH_4Cl-$NH_3 \cdot H_2O$ buffer, pH 7.7)

เตรียม 0.2 M แอมโมเนียมคลอไรด์

ชั่งแอมโมเนียมคลอไรด์	2.14	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

เตรียม 0.2 M แอมโมเนีย

แอมโมเนีย	1.1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	98.9	มิลลิลิตร

เตรียมแอมโมเนียบัฟเฟอร์ pH 7.7

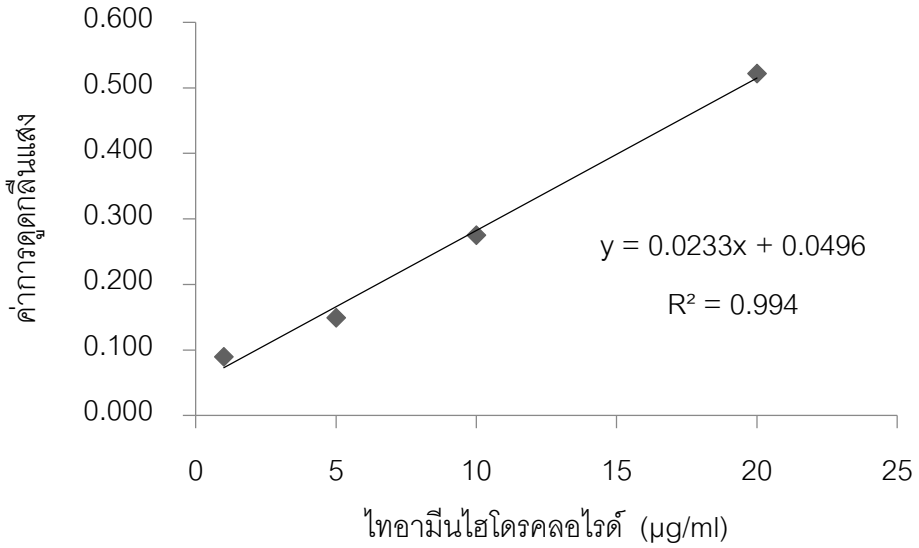
0.2 M แอมโมเนียมคลอไรด์	156	มิลลิลิตร
0.2 M แอมโมเนีย	4	มิลลิลิตร

2. 50 mMฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer, pH 5.6)

ชั่งโมโนโซเดียมฟอสเฟต	3.32	กรัม
ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.26	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ผลและการวิเคราะห์ทางสถิติ



ภาพภาคผนวกข-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (thiamine hydrochloride) วิธีการทางสเปกโตโฟโตเมตรี

ภาพภาคผนวกข-2 ภาพเปรียบเทียบเมล็ดข้าวกล้องและเอนโดสเปิร์มที่ขัดเอาส่วนของชั้นรำและจมูกข้าวออกด้วยกระดาษทราย

ตารางภาคผนวกข-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไทอามีนในข้าวกล้อง 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			

ตารางภาคผนวกข-2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไทอามีนในเมล็ดข้าว 30 พันธุ์ ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range test (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

ตารางภาคผนวกข-3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความหนาชั้นรำของข้าว 6 พันธุ์

	Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	5	.000	37.783	.000
Within Groups	.000	18	.000		
Total	.001	23			

ตารางภาคผนวกข-4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาชั้นรำของข้าว 6 พันธุ์ ด้วยวิธี DMRT

พันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
กข29	4	.036			
พิษณุโลก 2	4		.041		
สุพรรณบุรี 1	4		.041		
กข11	4		.043		
กข41	4			.048	
กข43	4				.051
Sig.		1.000	.093	1.000	1.000

ตารางภาคผนวกข-5 ค่าสหสัมพันธ์แบบเพียร์สันระหว่างความหนาชั้นรำและไทอามีนรวมของข้าว 6 พันธุ์

		ความหนาชั้นรำ	ไทอามีนรวม
ความหนาชั้นรำ	Pearson Correlation	1	.679**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

ตารางภาคผนวกข-6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาตรเมล็ดข้าวกล้องปริมาตรเอนโดสเปิร์มและปริมาตรชั้นรำข้าวของข้าว 6 พันธุ์

		Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ปริมาตรเมล็ดข้าวกล้อง	Between Groups	51.180	5	10.236	6.078	.002
	Within Groups	32.441	18	1.802		
	Total	83.621	23			
ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม	Between Groups	47.724	5	9.545	6.361	.001
	Within Groups	27.007	18	1.500		
	Total	74.731	23			
ปริมาตรชั้นรำ	Between Groups	.764	5	.153	12.704	.000
	Within Groups	.217	18	.012		
	Total	.981	23			

ตารางภาคผนวกข-7 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาตรเมล็ดข้าวกล้องของข้าว 6 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT

พันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
กข41	4	12.073	
สุพรรณบุรี 1	4	12.214	
พิษณุโลก 2	4	13.718	13.718
กข11	4	14.063	14.063
กข43	4		15.740
กข29	4		15.781
Sig.		.083	.060

ตารางภาคผนวกข-8 ค่าสหสัมพันธ์แบบเพียร์สันระหว่างปริมาตรเมล็ดข้าวกล้องและไทอามีนรวมของข้าว 6 พันธุ์

		ปริมาตรเมล็ดข้าวกล้อง	ไทอามีนรวม
ปริมาตรเมล็ดข้าวกล้อง	Pearson Correlation	1	-.022
	Sig. (2-tailed)		.918
	N	24	24

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

ตารางภาคผนวกข-9 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาตรเอนโดสเปิร์มของข้าวกล้อง 6 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT

พันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
กข41	4	10.695			
สุพรรณบรี 1	4	11.027	11.027		
พิษณุโลก 2	4	12.446	12.446	12.446	
กข11	4		12.695	12.695	12.695
กข43	4			14.011	14.011
กข29	4				14.551
Sig.		.070	.084	.103	.056

ตารางภาคผนวกข-10 ค่าสหสัมพันธ์แบบเพียร์สันระหว่างปริมาตรเอนโดสเปิร์มและไทอามีนรวมของข้าว 6 พันธุ์

		ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม	ไทอามีนรวม
ปริมาตรเอนโดสเปิร์ม	Pearson Correlation	1	-.081
	Sig. (2-tailed)		.706
	N	24	24

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

ตารางภาคผนวกข-11 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาตรชั้นรำข้าวของข้าวกล้อง 6 พันธุ์ ด้วยวิธี DMRT

พันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
สุพรรณบุรี 1	4	1.187		
กข29	4	1.231	1.231	
พิษณุโลก 2	4	1.271	1.271	
กข11	4		1.368	
กข41	4		1.378	
กข43	4			1.729
Sig.		.321	.096	1.000

ตารางภาคผนวกข-12 ค่าสหสัมพันธ์แบบเพียร์สันระหว่างปริมาตรชั้นรำและไทอามีนรวมของข้าว 6 พันธุ์

		ปริมาตรชั้นรำ	ไทอามีนรวม
ปริมาตรชั้นรำ	Pearson Correlation	1	.503*
	Sig. (2-tailed)		.012
	N	24	24

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

ตารางภาคผนวกข-13 ค่าสหสัมพันธ์แบบเพียร์สันระหว่างสัดส่วนของปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์ม ปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรชั้นรำ ปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาตรชั้นรำ และปริมาตรชั้นรำต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์มและไทอามีนรวมของข้าว 6 พันธุ์

		ไทอามีนรวม
ปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์ม	Pearson Correlation	.622**
	Sig. (2-tailed)	.001
	N	24
ปริมาตรเมล็ดต่อปริมาตรชั้นรำ	Pearson Correlation	-.539**
	Sig. (2-tailed)	.007
	N	24
ปริมาตรเอนโดสเปิร์มต่อปริมาตรชั้นรำ	Pearson Correlation	-.539**
	Sig. (2-tailed)	.007
	N	24
ปริมาตรชั้นรำต่อปริมาตรเอนโดสเปิร์ม	Pearson Correlation	.622**
	Sig. (2-tailed)	.001
	N	24

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

ตารางภาคผนวกข-14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความหนาแน่นเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวขาว 6 พันธุ์

	Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.283	5	.057	2.847	.046
Within Groups	.357	18	.020		
Total	.640	23			

ตารางภาคผนวกข-15 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวขาวทั้ง 6 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT

พันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
กข29	4	1.135	
กข43	4	1.321	1.321
กข11	4		1.385
กข41	4		1.390
พิษณุโลก 2	4		1.413
สุพรรณบุรี 1	4		1.480
Sig.		.078	.167

ตารางภาคผนวกข-16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการหาปริมาตรเอนโดสเปิร์มด้วยวิธีการแทนที่น้ำและวิธีการตัดตามขวาง

		Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กข41	Between Groups	.617	1	.617	.377	.562
	Within Groups	9.809	6	1.635		
	Total	10.425	7			
กข43	Between Groups	.265	1	.265	.253	.633
	Within Groups	6.264	6	1.044		
	Total	6.528	7			
สุพรรณบุรี 1	Between Groups	.000	1	.000	.000	.994
	Within Groups	12.217	6	2.036		
	Total	12.217	7			
กข29	Between Groups	1.284	1	1.284	.789	.409
	Within Groups	9.770	6	1.628		
	Total	11.054	7			
กข11	Between Groups	.076	1	.076	.021	.888
	Within Groups	21.245	6	3.541		
	Total	21.321	7			
พิษณุโลก 2	Between Groups	.006	1	.006	.040	.848
	Within Groups	.868	6	.145		
	Total	.874	7			

ตารางภาคผนวกข-17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการหาน้ำหนักเอนโดสเปิร์มด้วยวิธีการแทนที่น้ำ

	Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34.108	5	6.822	2.436	.075
Within Groups	50.411	18	2.801		
Total	84.519	23			

ตารางภาคผนวกข-18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการหาน้ำหนักเอนโดสเปิร์มด้วยวิธีการแทนที่น้ำและวิธีการตัดตามขวาง

		Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กข41	Between Groups	1.003	1	1.003	.829	.398
	Within Groups	7.253	6	1.209		
	Total	8.256	7			
กข43	Between Groups	.390	1	.390	.540	.490
	Within Groups	4.337	6	.723		
	Total	4.727	7			
สุพรรณบุรี 1	Between Groups	.001	1	.001	.000	.991
	Within Groups	23.949	6	3.992		
	Total	23.950	7			
กข29	Between Groups	1.831	1	1.831	1.465	.272
	Within Groups	7.501	6	1.250		
	Total	9.332	7			
กข11	Between Groups	.202	1	.202	.246	.637
	Within Groups	4.925	6	.821		
	Total	5.128	7			
พิษณุโลก 2	Between Groups	.001	1	.001	.000	.987
	Within Groups	28.076	6	4.679		
	Total	28.078	7			

ตารางภาคผนวกข-19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไทอามีนในจมูกข้าวของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์

	Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.122	5	.224	2.677	.056
Within Groups	1.509	18	.084		
Total	2.631	23			

ตารางภาคผนวกข-20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไทอามีนในชั้นรำข้าวของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์

	Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.372	5	.274	5.812	.002
Within Groups	.850	18	.047		
Total	2.222	23			

ตารางภาคผนวกข-21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไทอามีนในข้าวขาวของเมล็ดข้าว 6 พันธุ์

	Sum Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	5	.000	9.738	.000
Within Groups	.001	18	.000		
Total	.002	23			

ตารางภาคผนวกข-22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว 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			

ตารางภาคผนวกข-23 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว 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

ตารางภาคผนวกข-24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อมิลลิกรัมโปรตีนในข้าว 6 พันธุ์ที่แต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด

Dependent Variable: กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อมิลลิกรัมโปรตีน					
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			

ตารางภาคผนวกข-25 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อมิลลิกรัมโปรตีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดด้วยวิธี DMRT

กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อมิลลิกรัมโปรตีน					
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

ตารางภาคผนวกข-26 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อมิลลิกรัมโปรตีนในเมล็ดข้าว 6 พันธุ์ด้วยวิธี DMRT

กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase						
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