วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 29 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2567
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 29 (No.3) September – December 2024 บทความวิจัย

กิจกรรมของเอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine Kinase/Thiamine-Phosphate Pyrophosphorylase ในระหว่างการเจริญของเมล็ดข้าว

Activity of Hydroxymethylpyrimidine Kinase/Thiamine-Phosphate Pyrophosphorylase during Rice Grain Development

มณฑนี โพธิ์แสง[1], รัชดา ไชยเจริญ[2] และ ภาคภูมิ พระประเสริฐ[1*]

Monthani Phosaeng[1], Rachada Chaicharoen[2] and Phakpoom Phraprasert[1*]

[1] *ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย*

[2] *คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ประเทศไทย*

[1] *Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Thailand*

[2] *Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Thailand*

Received : 21 May 2024, Received in revised form : 13 August 2024, Accepted : 14 August 2024

Available online : 9 September 2024

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : ไทอามีน (thiamine) หรือวิตามินบี 1 (vitamin B1) เป็นวิตามินที่สำคัญต่อการทำงานของร่างกาย สามารถพบได้ในข้าว ธัญพืชอื่น ๆ เนื้อสัตว์ ไข่แดง เป็นต้น ซึ่งข้าวเป็นธัญพืชที่สำคัญเนื่องจากเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตสำคัญ ของประชากรส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในเอเชีย ซึ่งข้าวแต่ละพันธุ์มีปริมาณไทอามีนแตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการหาปริมาณไทอามีนในข้าวกล้องของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อศึกษาความแตกต่างในข้าวแต่ละพันธุ์ นอกจากนี้เอนไซม์ Hydroxymethylpyrimidine kinase/thiamine-phosphate pyrophosphorylase (HMPPK/ TMP-PPase) เป็นเอนไซม์สำคัญเอนไซม์หนึ่งในวิถีการสังเคราะห์ไทอามีน ในการศึกษานี้จึงทำการหากิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase เพื่อศึกษาระดับและรูปแบบกิจกรรมของเอนไซม์ในเมล็ดที่เจริญในระยะต่าง ๆ

วิธีดำเนินการวิจัย : ทำการปลูกข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ กข11 (RD11) กข43 (RD43) และสุพรรณบุรี 1 (SPR1) ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมและช่วงเวลาเดียวกัน จากนั้นนำข้าวกล้องที่ได้จากระยะเก็บเกี่ยวมาทำการสกัดด้วยน้ำและนำไปหาปริมาณไทอามีนโดย high performance liquid chromatography และได้ทำการสกัดและหากิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase จากเมล็ดข้าวในระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่า และระยะเก็บเกี่ยว

ผลการวิจัย : จากการทดลองพบว่า ข้าวแต่ละพันธุ์มีปริมาณไทอามีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Tukey HSD, $P \leq 0.05$) โดยที่ข้าวพันธุ์ กข11 มีปริมาณไทอามีนมากที่สุด 97 นาโนกรัมต่อเมล็ด รองลงมาได้แก่ พันธุ์สุพรรณบุรี1 และพันธุ์กข1 มีปริมาณไทอามีน 81 และ 74 นาโนกรัมต่อเมล็ด ตามลำดับ สามารถแบ่งข้าวที่ศึกษาในครั้งนี้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีปริมาณไทอามีนสูง ได้แก่ พันธุ์กข11 และกลุ่มที่มีปริมาณไทอามีนต่ำ ได้แก่ พันธุ์สุพรรณบุรี1 และพันธุ์กข43 และข้าวทั้งสามพันธุ์นี้มีรูปแบบกิจกรรมการแสดงออกของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase ที่สอดคล้องกัน คือ กิจกรรมของเอนไซม์เกิดน้อยที่สุดพบได้ในระยะดอกบาน แล้วกิจกรรมของเอนไซม์จะสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อข้าวอยู่ในระยะน้ำนม จนในระยะข้าวเม่ากิจกรรม

ของเอนไซม์จะสูงที่สุด และพบว่าเมื่อข้าวเจริญเข้าสู่ระยะเก็บเกี่ยว กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง โดยที่ข้าวพันธุ์กข11 มีระดับของกิจกรรมสูงที่สุด (0.37 n mole/mg protein/min) ในขณะที่ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และกข43 มีระดับใกล้เคียงกัน (0.20 และ 0.13 n mole/mg protein/min ตามลำดับ)

สรุปผลการวิจัย : ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase มีความแตกต่างกันในแต่ละระยะการเจริญ และสอดคล้องกับปริมาณไทอามีนที่พบในข้าวกล้องของข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวไทอามีนสูงต่อไป

คำสำคัญ : ไทอามีน ; ข้าว ; ไฮดรอกซีเมททิลไพริมิดีน ไคเนส ; ไทอามีน-ฟอสเฟต ไพโรฟอสโฟรีเลส

Abstract

Background and Objectives : Thiamine, or vitamin B1 is an essential for human body functions and can be found in foods including rice, cereals, meat, and egg yolk. Rice is one of a staple carbohydrate for 50% of world population, especially in Asia. The amount of thiamine in rice varies among different varieties. As a result, Thiamine content in brown rice was studied to access the variation among rice varieties. Hydroxymethylpyrimidine kinase/thiamine-phosphate pyrophosphorylase (HMPPK/TMP-PPase) is one of key enzymes in thiamine biosynthesis. Consequently, HMPPK/TMP-PPase activity was investigated to better understand the level and pattern of this enzyme in rice grain during four developmental stages.

Methodology : Three varieties of rice, RD11, RD43, and Suphanburi 1 (SPR1), were grown in the same environment and time frame. Brown rice was collected at the harvest stage and then extracted by water and used to determine the thiamine content by high performance liquid chromatography. Additionally, the HMPPK/TMP-PPase was extracted and determined the activity in rice grain at four developmental stages: flowering, milky, dough, and harvest.

Main Results : The result showed different varieties accumulate statistic significantly different thiamine content (Tukey HSD, $P \leq 0.05$). RD11 had the highest thiamine content at 97 ng/grain followed by SPR1 with 81 and 74 ng/grain, respectively. This experiment can categorized rice of this studied into 2 groups: high thiamine content (RD11) and lower thiamine content (SPR1 and RD43). The study of HMPPK/TMP-PPase activity revealed a consistent pattern across all 3 varieties. The HMPPK/TMP-PPase activity was lowest during the flowering, increased during milky, reached its highest level during the dough stage, and then decreased at harvest stage, both per grain and per protein basis. The average HMPPK/TMP-PPase activity across all grain developmental stages was highest in RD11 (0.37 n mole/mg protein/min), compared to SPR1 and RD43 (0.20 and 0.13 n mole/mg protein/min, respectively).

Conclusions : The activity of HMPPK/TMP-PPase varied among the developmental stages of rice grain. The activity of this enzyme was correlated with the thiamine content in 3 rice varieties. These findings will be valuable data for the breeder aiming to develop rice varieties with high thiamine content.

Keywords : thiamine ; *Oryza sativa* L. ; hydroxymethylpyrimidine kinase ; thiamine-phosphate pyrophosphorylase

***Corresponding author. E-mail** : phakpoom@buu.ac.th

บทนำ

ไทอามีน (thiamine) หรือวิตามินบี 1 (vitamin B1) เป็นวิตามินที่สำคัญ เนื่องจากจำเป็นต่อการทำงาน ของร่างกาย เช่น การทำงานของกล้ามเนื้อและหลอดเลือดหัวใจ การทำงานของระบบประสาท ระบบหายใจและการสร้างพลังงานของเซลล์ เป็นต้น (Marrs & Lonsdale, 2021) ทั้งนี้มีรายงานว่าไทอามีนมีครึ่งชีวิตสั้นเพียง 1-2 ชั่วโมง จึงทำให้อาการขาดไทอามีนเกิดขึ้นได้ในเวลาเพียง 2-3 เดือนเท่านั้น ดังนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องได้รับไทอามีนอย่างต่อเนื่องจากอาหารที่รับประทาน เช่น ธัญพืช ตับ นม ไข่และเนื้อสัตว์ เป็นต้น (Whitfield *et al*., 2018)

ข้าวเป็นธัญพืชชนิดหนึ่งที่เป็นแหล่งไทอามีนที่สำคัญ โดยเฉพาะในภูมิภาคที่บริโภคข้าวเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตหลัก โดยข้าวมีการสะสมไทอามีน มากในชั้นรำและเอ็มบริโอ จึงทำให้ข้าวกล้องมีปริมาณไทอามีนมากกว่าข้าวที่ผ่านการขัดสี (Balakrishna & Farid, 2020) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาปริมาณไทอามีน ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า มีปริมาณไทอามีนอยู่ระหว่าง 0.14-0.45 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างกันประมาณ 3 เท่า (Phosaeng, *et al*., 2018) ทั้งนี้การสังเคราะห์ไทอามีนในพืชเกิดจากสองส่วนด้วยกันคือ จากการสังเคราะห์ pyrimidine และ thiazole จากนั้นจึงนำทั้งสองส่วนมาร่วมกันได้ thiamine monophosphate ซึ่งเกิดขึ้นในพลาสติด (plastid) (Belanger *et al*., 1995) โดยในส่วนของการสังเคราะห์ pyrimidine มี 5-aminoimidazole ribonucleotide เป็นสารตั้งต้น และเปลี่ยนเป็น hydroxymethylpyrimidine monophosphate (HMP-P) โดยเอนไซม์ HMP-P synthase จากนั้นจะได้รับการเติมฟอสเฟตโดยเอนไซม์ hydroxymethylpyrimidine diphosphate kinase (HMPK) ได้ hydroxymetnylpyrimidine diphosphate (HMP-PP) ส่วนการสังเคราะห์ thiazole สังเคราะห์จากรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) หรือไกลซีน (glycine) และ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) ได้ hydroxyethylthiazole phosphate (HET-P) ซึ่งจะรวมกับ HMP-PP ได้ thiamine monophosphate ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย hydroxymetnylpyrimidine diphosphate kinase (HMPPK) จากนั้นฟอสเฟตจะถูกนำออกโดยเอนไซม์ thiamin-phosphate pyrophosphorylase (TMP-PPase) ได้ thiamine (Minhas *et al*., 2018) (Figure 1)

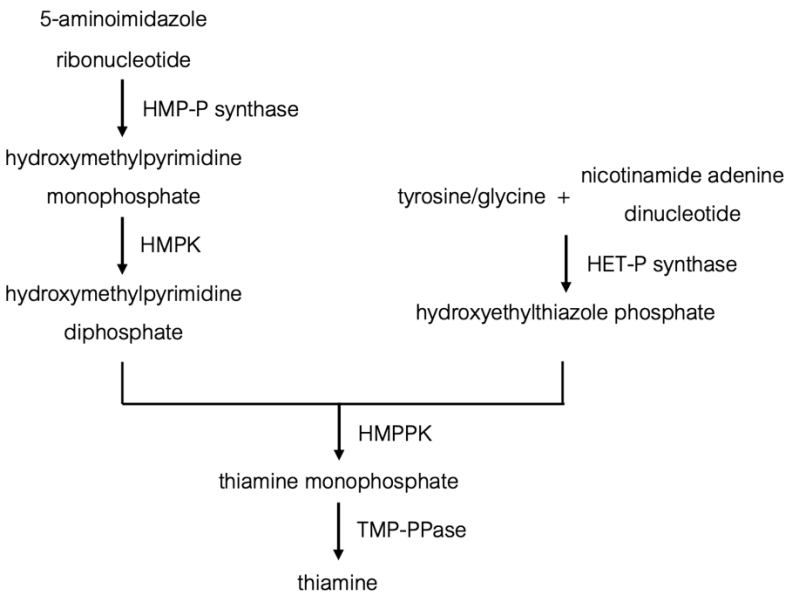

Figure 1 The pathway of thiamine biosynthesis (ดัดแปลงจาก Goyer (2010))

อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าโปรตีน HMPPK เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาได้ 2 ปฏิกิริยา คือ ด้าน N-terminal ทำหน้าที่เป็น HMPPK ส่วนด้าน C-terminal ทำหน้าที่เป็น TMP-PPase (Kim *et al*., 1998) ซึ่งเอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในการรวม HMP-P กับ HET-P เข้าด้วยกันได้ thiamine monophosphate ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase ในข้าวพันธุ์ต่างกันเพื่อศึกษารูปแบบการทำงาน และเพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่พบในเมล็ดข้าว รวมทั้งศึกษาระดับการทำงานของเอนไซม์นี้ในเมล็ดที่เจริญในระยะต่าง ๆ โดยเลือกศึกษาในข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ กข11 กข43 และสุพรรณบุรี 1 เนื่องจากเป็นข้าวที่ให้ผลผลิตสูงและไม่ไวต่อแสงทำให้สามารถปลูกได้ตลอดปี

วิธีดำเนินการวิจัย

การปลูกข้าว

ทำการปลูกข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ กข11 (RD11) กข43 (RD43) และสุพรรณบุรี 1 (SPR1) โดยเพาะต้นกล้าในจานแก้วเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นจึงย้ายปลูกลงในกระถางที่มีดิน 1 กิโลกรัม ผสมกับปุ๋ยละลายช้าสูตร 13-13-13 10 กรัม กระถางละ 1 ต้น จำนวนพันธุ์ละ 3 กระถาง จากนั้นนำกระถางดังกล่าวไปแช่น้ำที่ควบคุมให้น้ำอยู่ที่ระดับผิวดิน จากนั้นดูแลรักษาจนกระทั่งข้าวเจริญเติบโตถึงระยะต่าง ๆ ได้แก่ ระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเจริญเต็มที่ ทำการเก็บตัวอย่างข้าวในระยะดังกล่าวเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การสกัดและหาปริมาณไทอามีนในข้าว

นำเมล็ดข้าวกล้องที่อยู่ในระยะเก็บเกี่ยวของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ กข11 กข43 และสุพรรณบุรี 1 จำนวนพันธุ์ละ 20 เมล็ด นำมาบดให้ละเอียดจากนั้นเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร บดอีกครั้งจนเป็นเนื้อเดียวกันโดยบดด้วยโกร่งที่เย็นด้วยการแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 25 นาที จากนั้นเก็บสารละลายส่วนใสและนำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณไทอามีนด้วย HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Moongngarm & Saetung (2010) โดยใช้คอลัมน์ C-18 (Infinity Lab Poroshell 120EC-C18, 4.6x150 mm, 4um Agilent) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้ 50 mM phosphate buffer ที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.6 ผสมกับ acetonitrile ที่อัตราส่วน 80:20 v/v เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ปรับให้มีอัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจหาไทอามีนด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 233 นาโนเมตร เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับกราฟมาตรฐานของไทอามีนไฮโดรคลอไรด์เพื่อหาปริมาณไทอามีน

การสกัดและหาปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวเปลือกของข้าวทั้ง 3 พันธุ์ โดยเก็บจาก 4 ระยะ ได้แก่ ระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเจริญเต็มที่ เก็บมาระยะละ 50 เมล็ด จากนั้นนำมาใช้ในการสกัดโปรตีนด้วย 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) โดยบดด้วยโกร่งที่แช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา นำตัวอย่างที่บดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาเก็บสารละลายส่วนใสและนำไปหาปริมาณโปรตีนด้วย Bradford's assay โดยใช้สารสะลายส่วนใส 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลายแบรดฟอร์ดปริมาตร 1,450 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยสเปกโตโฟโตมิเตอร์ ทำการหาปริมาณโปรตีนโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin

การหากิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase

หากิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase โดยดัดแปลงจากวิธีของ Rapala-Kozik *et al.* (2008) ซึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วย 50 µM HMP, 50 µM HET-P, 10 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$ และสารละลายส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนการสกัดโปรตีนปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 3 มิลลิลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 2 และ 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 3 M HCl และนำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จึงทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ปรับความเป็นกรด-เบสเป็น 4.5 ด้วย 4 M โซเดียมอะซีเตท แล้วจึงทำการเปลี่ยนอนุพันธ์ของไทอามีน (thiamine phosphates) ไปเป็นไทอามีนโดยการเติม 1% takadiastase 500 ไมโครลิตร นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปหาปริมาณไทอามีนโดยใช้วิธีการเดียวกับการหาปริมาณไทอามีนข้างต้น

การวางแผนการทอลองและวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (complete randomized design) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วย one-way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลด้วย Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม PSPP เวอร์ชั่น 2.0.1

ผลการวิจัย

นำข้าวกล้องพันธุ์ กข11 กข43 และสุพรรณบุรี 1 ไปวิเคราะห์หาปริมาณไทอามีน พบว่า ข้าวพันธุ์ กข11 มีปริมาณไทอามีนมากที่สุด 97 นาโนกรัมต่อเมล็ด รองลงไปได้แก่พันธุ์ สุพรรณบุรี 1 มี 81 นาโนกรัมต่อเมล็ด และกข43 74 นาโนกรัมต่อเมล็ด ตามลำดับ และเมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า พันธุ์ข้าวต่างกันมีปริมาณไทอามีนต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยสามารถแบ่งข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีปริมาณไทอามีนสูง ได้แก่ข้าวพันธุ์ กข11 และกลุ่มที่มีปริมาณไทอามีนน้อย ได้แก่ข้าวพันธุ์ สุพรรณบุรี 1 และ กข43 (Figure 2) โดยกลุ่มที่มีปริมาณไทอามีนน้อยมีปริมาณไทอามีนต่ำกว่าพันธุ์ที่มีไทอามีนสูงเฉลี่ยประมาณ 20%

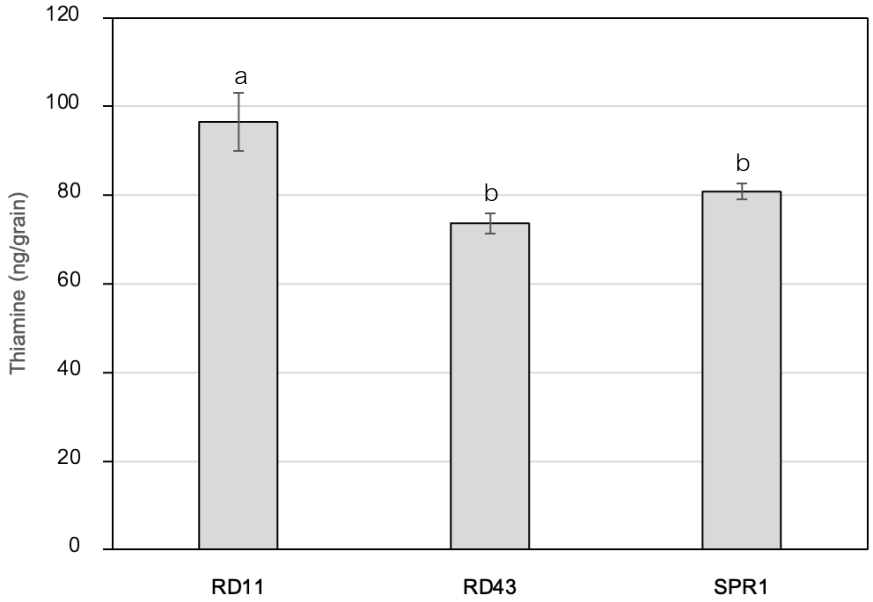

Figure 2 Thiamine content in brown rice of RD11, RD43, and SPR1. (Error bars show ±SD). The letter on graph shows the statistic difference at $P \leq 0.05$ by Tukey HSD.

เมื่อนำข้าวเปลือกที่เจริญในระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเจริญเต็มที่มาทำการสกัดและหากิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase ของข้าวทุกพันธุ์มีแนวโน้มคล้ายกันคือในระยะดอกบานมีกิจกรรมของ HMPPK/TMP-PPase น้อยที่สุด จากนั้นจะมีกิจกรรมสูงขึ้นในระยะน้ำนมและมี

กิจกรรมสูงที่สุดในระยะข้าวเม่า จากนั้นกิจกรรมจะลดลงในระยะเจริญเต็มที่ ทั้งจากการพิจารณาบนพื้นฐานของกิจกรรมต่อเมล็ด (Figure 3) และต่อปริมาณโปรตีน (Figure 4) โดยเมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าระยะการเจริญของเมล็ดมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

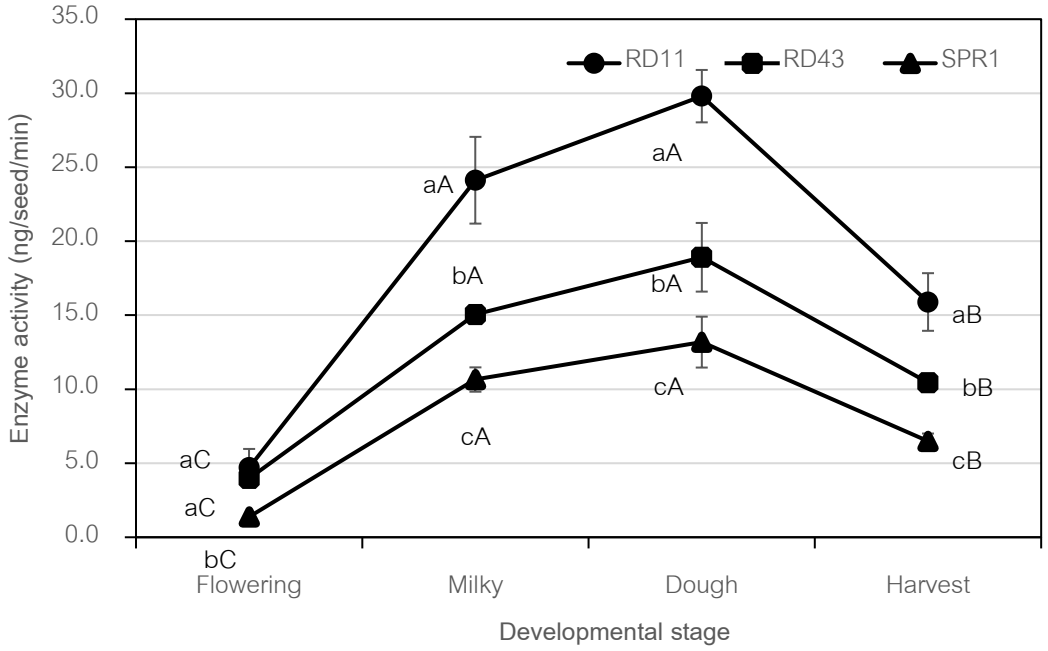

Figure 3 The activity of HMPPK/TMP-PPase per seed during ears development in RD11, RD43, and SPR1. (Error bars show ±SD. The letter on graph shows the statistic difference at P≤0.05 by Tukey HSD when compared at each developmental stage among varieties (low case letter) and different developmental stages of each variety (capital letter).)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase ของข้าวแต่ละพันธุ์ พบว่า ในทุกระยะการเจริญข้าวพันธุ์ กข11 มีกิจกรรมมากที่สุด รองลงไปได้แก่ กข43 และ สุพรรณบุรี 1 ตามลำดับ โดยพบว่ามีกิจกรรมของ HMPPK/TMP-PPase แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) ทั้งจากการวิเคราะห์บนพื้นฐานของกิจกรรมต่อเมล็ด (Figure 3) และต่อปริมาณโปรตีน (Figure 4) อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้หากพิจารณาแนวโน้มของกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase จะเห็นได้ว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase สูง ได้แก่ ข้าวพันธุ์ กข11 และกลุ่มที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ ได้แก่ พันธุ์ กข43 และสุพรรณบุรี ซึ่งมีความสอดคล้องกับปริมาณไทอามีนในข้าวกล้อง กล่าวคือพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase สูงจะมีปริมาณไทอามีนในข้าวกล้องสูงด้วยเช่นกัน

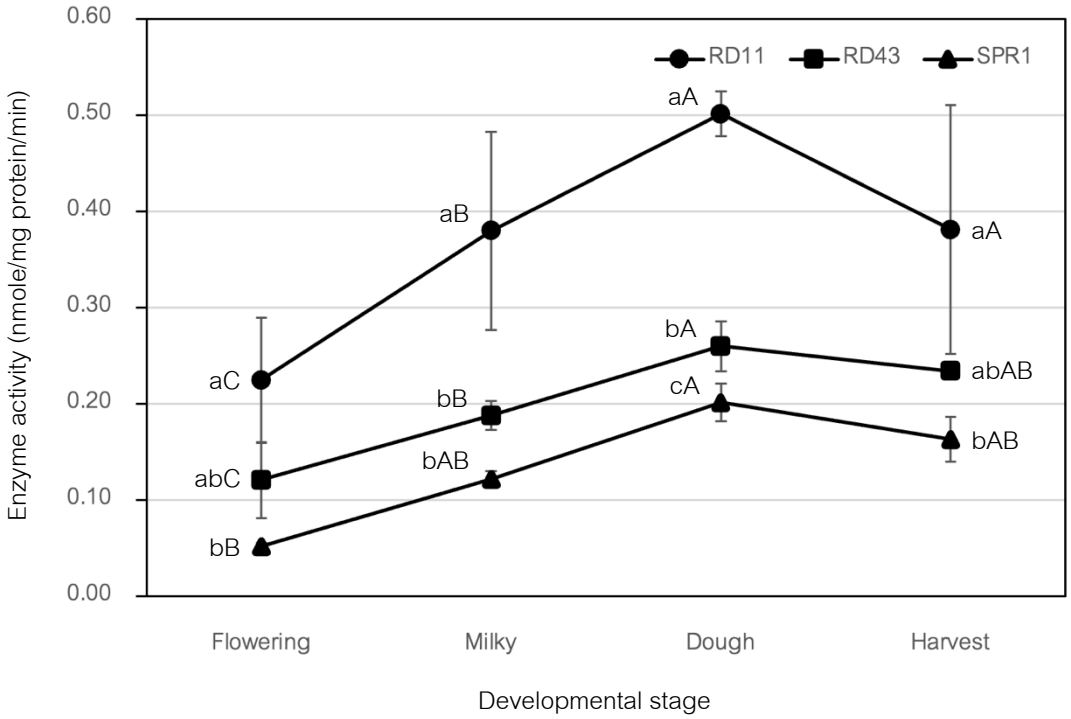

Figure 4 The activity of HMPPK/TMP-PPase on protein basis during ears development in RD11, RD43, and SPR1. (Error bars show ±SD. The letter on graph shows the statistic difference at P≤0.05 by Tukey HSD when compared at each developmental stage among varieties (low case letter) and different devolopmental stages of each variety (capital letter).)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาปริมาณไทอามีนในข้าว 3 พันธุ์ พบว่ามีปริมาณไทอามีนในข้าวกล้องแตกต่างกัน โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 74-97 นาโนกรัมต่อเมล็ด จากการวิเคราะห์ทางสถิติทำให้สามารถแบ่งข้าวพันธุ์ที่ศึกษาออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีปริมาณไทอามีนสูง และปริมาณไทอามีนต่ำ ซึ่งการที่ข้าวแต่ละพันธุ์มีปริมาณไทอามีนแตกต่างกันอาจเนื่องมาจาก สัณฐานของเมล็ดที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานว่าเมล็ดข้าวมีการสะสมไทอามีนมากบริเวณชั้นรำและเอ็มบริโอ (Mangel *et al*., 2022) จากรายงานของ Phosaeng & Phraprasert (2019) พบว่า ข้าวพันธุ์ กข11 มีการสะสมไทอามีนมากที่สุดบริเวณชั้นรำคือ 71.9 นาโนกรัมต่อเมล็ด ส่วนพันธุ์ กข43 และสุพรรณบุรี 1 มีปริมาณ 52.6 และ 65.1 นาโนกรัมต่อเมล็ด ตามลำดับ โดยพบว่ามีปริมาณไทอามีนในเอ็มบริโอในข้าวพันธุ์ กข 11 กข43 และสุพรรณบุรี 1 เท่ากับ 13.9 10.1 และ 11.5 นาโนกรัมต่อเมล็ด ตามลำดับ

การศึกษากิจกรรมการสังเคราะห์ไทอามีนของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase ในข้าว 3 พันธุ์ พบว่ามีรูปแบบการทำงานของเอนไซม์คล้ายคลึงกันทั้งการพิจารณาบนพื้นฐานของเมล็ดและปริมาณโปรตีนคือมีกิจกรรมน้อยในระยะดอกบาน จากนั้นจะมีกิจกรรมสูงขึ้นในระยะน้ำนม แล้วมีกิจกรรมมากที่สุดในระยะข้าวเม่า จากนั้นกิจกรรมจะลดลงในระยะเก็บเกี่ยว ทั้งนี้เมื่อดอกได้รับการผสมจึงเริ่มมีการเจริญของผล และเริ่มมีกิจกรรมต่าง ๆ เกิดขึ้น ซึ่งในระยะดอกบานของข้าวเป็นระยะที่ดอกเพิ่งได้รับการผสมและมีเกสรเพศผู้เจริญออกมาจากดอกจึงเป็นระยะที่มีกิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด เมื่อดอกเจริญพัฒนาเข้าสู่ระยะน้ำนม ซึ่งเป็นระยะที่ภายในดอกข้าวมีของเหลวสีขาวคล้ายน้ำนม มีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลที่จะนำไปใช้ในการสร้างแป้ง มีรายงานว่าในระยะนี้มีกิจกรรมต่าง ๆ เกิดขึ้นจำนวนมากทั้งการแบ่งเซลล์และการสังเคราะห์สารต่าง ๆ เห็นได้จากการสังเคราะห์โปรตีนที่สูงขึ้น (Lee & Goh, 2011) และระยะนี้เป็นระยะที่มีความสำคัญต่อปริมาณผลผลิตและคุณภาพของข้าว (Huang *et al*., 2020) และพบว่า HMPPK/TMP-PPase มีกิจกรรมที่สูงขึ้น จากการที่ข้าวสร้างแป้งสะสมภายในเอนโดสเปิร์ม มีผลทำให้จากระยะน้ำนมที่มีของเหลวสีขาว มีการพัฒนาต่อไปเป็นเมล็ดข้าว โดยเมล็ดมีการเปลี่ยนสีจากสีขาวน้ำนมเป็นเมล็ดที่มีสีเขียวเรียกว่าระยะข้าวเม่า ระยะข้าวเม่านี้มีการสะสมแป้งมากขึ้น และที่สำคัญคือมีการสร้างคลอโรฟิลล์จึงทำให้เป็นระยะที่เมล็ดมีสีเขียว และสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาเมล็ด (Chen *et al*., 2020) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าระยะนี้เป็นระยะที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase มากที่สุด ซึ่ง Minhas *et al*. (2018) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์นี้เกิดขึ้นในพลาสติด (plastid) ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase ที่มีมากขึ้นกว่าระยะน้ำนม หลังจากระยะข้าวเม่าสิ้นสุดแล้วข้าวจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลอ่อน และปริมาณน้ำในเมล็ดลดลงเข้าสู่ระยะเก็บเกี่ยว ซึ่งกิจกรรมต่าง ๆ ของเมล็ดในระยะนี้จะค่อย ๆ ลดลงโดยมีการสังเคราะห์โปรตีนลดลง (Lee & Goh, 2011) ซึ่งสอดคล้องกับการที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase ลดลง

อย่างไรก็ตามการที่ข้าวทั้งสามพันธุ์มีปริมาณไทอามีนและกิจกรรมของ HMPPK/TMP-PPase แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากปัจจัยหลายประการ เช่น อายุการเก็บเกี่ยว (Rice Department, 2019) โครงสร้างของเมล็ด (Phosaeng & Phraprasert, 2019) ปริมาณ Thiamine binding protein (Golda *et al*., 2004) ระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน รวมทั้งการควบคุมการแสดงออกของยีน (Graziano *et al*., 2020) ปริมาณสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไทอามีน (Li *et al*., 2019) เป็นต้น เมื่อพิจารณาปริมาณไทอามีนในเมล็ดร่วมกับกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase พบว่า ปริมาณไทอามีนในข้าวกล้องมีความสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase โดยพันธุ์ข้าวที่มีไทอามีนสูง ได้แก่ กข11 มีกิจกรรมของ HMPPK/TMP-PPase สูงที่สุด ส่วนพันธุ์ที่มีไทอามีนต่ำ ได้แก่ กข43 และสุพรรณบุรี 1 มีกิจกรรมของเอนไซม์นี้ต่ำกว่า ทั้งนี้การพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีกิจกรรมของเอนไซม์นี้สูงขึ้น อาจจะทำให้พันธุ์ข้าวที่ได้มีปริมาณไทอามีนเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามไทอามีนมีการสะสมมากที่ชั้นรำ สำหรับการทดลองนี้พบว่าระยะน้ำนมเป็นระยะที่น่าสนใจในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ เนื่องจากยังเป็นระยะที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าระยะข้าวเม่า แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ได้ อย่างไรก็ตามยังมีจำเป็นต้องมีการวิจัยเพื่อศึกษาผลและความเป็นไปได้ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาปริมาไทอามีนในข้าวพันธุ์ กข11 กข43 และสุพรรณบุรี 1 และการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าสามารถแบ่งข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีปริมาณไทอามีนสูง ได้แก่ ข้าวพันธุ์ กข11 และกลุ่มที่มีปริมาณไทอามีนต่ำ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ กข43 และสุพรรณบุรี 1 ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase และพบว่าในข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ระยะดอกบานเป็นระยะที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPPK/TMP-PPase น้อยที่สุด และเพิ่มขึ้นในระยะน้ำนม จนกระทั่งมีกิจกรรมสูงที่สุดในระยะข้าวเม่า และลดลงอีกครั้งในระยะเก็บเกี่ยว ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการพิจารณาปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีปริมาณไทอามีนสูงขึ้นเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของข้าว

เอกสารอ้างอิง

Balakrishna, A.K., & Farid, M. (2020). Enrichment of rice with natural thiamine using high-pressure processing (HPP). *Journal of Food Engineering, 110040*, 1-8.

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), 809-21.

Chen, J., Cao, F., Li, H., Shan, S., Tao, Z., Lei, T., Liu, Y., Xiao, Z., Zou, Y., Huang, M., & Abou-Elwafa, S.F. (2020). Genotypic variation in the grain photosynthetic contribution to grain filling in rice. *Journal of Plant Physiology, 253*, *153269,* 1-7.

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: Aspect of its metabolism and functions. *Phytochemistry, 71*, 1615-1624.

Graziano, S., Marmiroli, N., & Gullì, M. (2020). Proteomic analysis of reserve proteins in commercial rice cultivars. *Food Science and Nutrition, 8*(4), 1788-1797.

Huang, J., Pan, Y., Chen, H., Zhang, Z., Fang, C., Shao, C., Amjad, H., Lin, W., & Lin, Wen. (2020). Physiochemical mechanisms involved in the improvement of grain-filling, rice quality mediated by related enzyme activities in the ratoon cultivation system. *Field Crops Research, 258*, 107962, 1-13.

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

Lee, J., & Koh, H.J. (2011). A label-free quantitative shotgun proteomics analysis of rice grain development. *Proteome Science, 9*, 61, 1-10.

Li, K., Wang, D., Gong, L., Lyu, Y., Guo, H., Chen, W., Jin, C., Liu, X., Fang, C., & Luo, J. (2019). Comparative analysis of metabolome of rice seeds at three developmental stages using a recombinant inbred line population. *The Plant Journal, 100*, 908–922.

Mangel, N., Fudge, J.B., Gruissem, W., Fitzpatrick, T.B., & Vanderschuren, H. (2022). Natural variation in vitamin B_1 and vitamin B_6 contents in rice germplasm. *Frontier in Plant Science, 13*, 856880, 1-19.

Marrs, C., & Lonsdale, D. (2021). Hiding in plain sight: Modern thiamine deficiency. *Cells, 10*, 1-20.

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

Minhas, A.P., Tuli, R., & Puri, S. (2018). Pathway editing targets for thiamine biofortification in rice grains. *Frontier in Plant Science, 9*, 975, 1-8.

Phosaeng, M., Junprasert, K., & Phraprasert, P. (2018). Variability of thiamine concentration in Thai rice. *Burapha Science Journal, 23* (2), 1084-1093.

Phosaeng, M., & Phraprasert, P. (2019). Grain morphology and thiamine content in Thai rice (*Oryza sativa* L.) grains. *Thai Agricultural Research Journal, 37*(2), 151-164.

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.

Rice Department. (2019). Certified Rice Varieties That Popularly Grown Today. Bangkok: Art Qualify.

Whitfield, K.C., Bourassa, M.W., Adamolekun, B., Bergeron, G., Bettendorff, L., Brown, K.H., Cox, L., Fattal-Valevski, A., Fischer, P.R., Frank, E.L., Hiffler, L., Hlaing, L.M., Jefferds, M.E., Kapner, H., Kounnavong, S., Mousavi,M. P.S., Roth, D.E., Tsaloglou, M.-N., Wieringa, F., & Combs Jr., G.F. (2018). Thiamine deficiency disorders: diagnosis, prevalence, and a roadmap for global control programs. *Annals of the New York Academy of Science, 1430*, 3–43.