วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.3) September – December 2021 บทความวิจัย

การสังเคราะห์ไทอามีนระหว่างการเจริญของเมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

Thiamine Biosynthesis during Grain Development of Rice Cultivars

มณฑนี โพธิ์แสง และ ภาคภูมิ พระประเสริฐ*

Monthani Phosaeng and Phakpoom Phraprasert*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University

Received : 25 January 2021

Revised : 8 April 2021

Accepted : 15 April 2021

บทคัดย่อ

ข้าวเป็นอาหารจากธัญพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก มีคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญโดยเฉพาะวิตามินบี 1 หรือไทอามีน (thiamine) และมีรายงานว่าข้าวพันธุ์ต่างกันมีปริมาณไทอามีนต่างกัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาปริมาณไทอามีนในข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ กข29 กข41 และพิษณุโลก 2 ที่ระยะเจริญเต็มที่ และได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase (Hydroxymethylpyrimidine kinase/thiamine-phosphate pyrophosphorylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในวิถีการสังเคราะห์ไทอามีน โดยศึกษาในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด ได้แก่ ระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเจริญเต็มที่ จากการทดลองพบว่า ข้าว 3 พันธุ์ มีปริมาณไทอามีนอยู่ระหว่าง 0.068-0.072 μg/grain ส่วนการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase พบว่า เมื่อเมล็ดมีการพัฒนาหลังจากดอกบานกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-Pase ต่อปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มสูงขึ้นและสูงที่สุดในระยะข้าวเม่าจากนั้นลดลงในระยะเจริญเต็มที่ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อเมล็ดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนมและสูงที่สุดในระยะข้าวเม่าจากนั้นลดลงในระยะเจริญเต็มที่ โดยกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในทุกระยะการเจริญของเมล็ดของข้าวพันธุ์ กข41 กข29 และพิษณุโลก 2 มีค่าเฉลี่ยเป็น 0.034 0.041 และ 0.062 nmole/grain/min ตามลำดับ ซึ่งพบว่าระดับกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-Pase นี้มีแนวโน้มสัมพันธ์กับปริมาณไทอามีนที่สะสมในเมล็ดข้าว

คำสำคัญ : ไทอามีน ; วิตามินบี 1 ; ข้าว ; ระยะการเจริญของเมล็ด ; HMPK/TMP-PPase

Abstract

Rice is one of the most important cereals of the world. It is nutritious cereal grain include of vitamin B1 or thiamine. The difference cultivars of rice accumulate different amount of thiamine. In this study, thus, was quantified thiamine in 3 rice cultivars, RD29, RD41, and PSL 2, in their maturity (harvest) stage. The key enzyme of biosynthetic pathway, HMPK/TMP-PPase (Hydroxymethylpyrimidine kinase/thiamine-phosphate pyrophosphorylase), was also determined. Thiamine in 3 rice cultivars was between 0.068 - 0.072 μg/grain. The activity of HMPK/TMP-PPase increased from the flowering stage to milky stage and illustrated the highest activity in dough stage then decreased in maturity stage. The average activity of this enzyme on three diverse rice cultivars from every development stages were 0.034 0.041 and 0.062 nmole/grain/min, respectively. The study demonstrates that the activity of HMPK/TMP-PPase trend related to thiamine accumulate in rice grain.

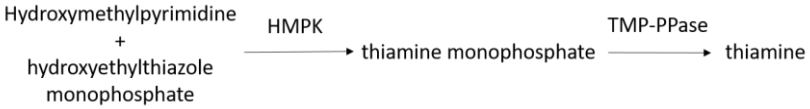
Keywords : thiamine, vitamin B1, rice, grain developing stages, HMPK/TMP-PPase

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

บทนำ

ข้าวเป็นอาหารหลักของคนในทวีปเอเชียมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันและมีการส่งออกไปยังภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลก ข้าวที่ได้รับความนิยมในการบริโภคคือข้าวที่ผ่านการขัดสีเหลือแต่เอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) ซึ่งมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักทำให้สารโภชนาการที่มีประโยชน์ต่าง ๆ เช่น วิตามิน โปรตีน และแร่ธาตุ ที่สะสมบริเวณชั้นรำและเอ็มบริโอ (embryo) ถูกขัดออกไป (Verma & Srivastrav, 2020) ทั้งนี้วิตามินบี 1 หรือ ไทอามีน (Thiamine) เป็นหนึ่งในวิตามินที่พบได้มากบริเวณชั้นรำและเอ็มบริโอ มีรายงานว่าผู้ที่ขาดวิตามินบี 1 ทำให้เป็นโรคเหน็บชา (Beriberi) การทำงานของเนื้อเยื่อและระบบประสาทผิดปกติ นอกจากนี้การขาดไทอามีนยังมีผลให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ มีผลต่อระบบหายใจและอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ (Smith *et al*., 2020)

การศึกษาปริมาณไทอามีนในข้าวไทย พบว่า ข้าวสารกล้องมีไทอามีนอยู่ระหว่าง 0.144-0.447 mg/100 g (Phosaeng, 2018) ซึ่งแสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่ามีความแตกต่างกันอย่างมากในข้าวแต่ละพันธุ์ โดยต่างกันมากกว่า 3 เท่า และการศึกษาปริมาณไทอามีนในข้าวสาลี 49 พันธุ์ พบว่า ข้าวสาลีแต่ละพันธุ์มีปริมาณไทอามีนแตกต่างกัน โดยพบว่ามีปริมาณอยู่ระหว่าง 0.026-0.61 mg/100 g ซึ่งต่างกันได้มากกว่า 2 เท่า (Batifoulier *et al*., 2006) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ อาจมีการสร้างและสะสมไทอามีนรวมในปริมาณที่ต่างกัน โดยชนิด พันธุ์และระยะการพัฒนาของเมล็ดส่งผลต่อปริมาณของไทอามีนในเมล็ด Buchholz, Drotleff, and Ternes (2012) ทำการศึกษาในธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวทริทิเคลี ข้าวไรน์ ข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เลย์ พบว่าไทอามีนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นขณะที่เมล็ดพัฒนาระยะต่าง ๆ โดยมีอัตราการสร้างมากที่สุดในช่วงแรกของการพัฒนา จากนั้นจะคงที่ถึงระยะเก็บเกี่ยว ซึ่งอัตราการสร้างไทอามีนที่ต่างกันในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดอาจเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละระยะทำงานได้แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างไทอามีน Goyer (2010) รายงานว่าเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase (Hydroxymethylpyrimidinekinase/thiamine-phosphate pyrophosphorylase) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเติมฟอสเฟตให้วงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) และเร่งการรวมตัวกันของวงแหวนไพริมิดีนและวงแหวนไทแอโซล (thiazole) ได้เป็นโครงสร้างของไทอามีนโมโนฟอสเฟตก่อนเปลี่ยนรูปเป็นไทอามีน (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การสังเคราะห์ไทอามีนโดยเอ็นไซม์ Hydroxymethylpyrimidinekinase (HMPK) และ thiamine- phosphate pyrophosphorylase (TMP-PPase)

หากพืชขาดเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase จะทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ไทอามีนได้ ทั้งนี้ Rapala-Kozik *et al.* (2007) รายงานว่าโปรตีน THI3 ในข้าวโพดมีคุณสมบัติของสองเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีน คือเอนไซม์ HMPK ทางด้านปลาย N ของสายโพลีเพพไทด์และเอนไซม์ TMP-PPase ทางด้านปลาย C ของสายโพลีเพพไทด์สามารถสังเคราะห์ไทอามีนโมโนฟอสเฟสได้จากสารตั้งต้น HMP (hydroxymethylpyrimidine) และ HET-P (hydroxyethylthiazole

monophosphate) เมื่อมีแมกนีเซียมเป็นโคแฟกเตอร์เช่นเดียวกับโปรตีน BTH1 ที่พบในในผักกาด (*Brassica napus*)(Kim *et al*., 1998) จากการสืบค้นในฐานข้อมูลโปรตีนพบว่าโปรตีน THI3 ในข้าวโพดมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีนในข้าว 77 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมากกว่าในถั่ว *Medicago truncatula* ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีน THI3 ในข้าวโพดเพียง 63 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าโปรตีนที่พบใน ถั่ว *Medicago truncatula* มีคุณสมบัติเป็น bi-functional protein (Rapala-Kozik *et al*., 2007) ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดข้าว

การศึกษาปริมาณไทอามีนรวมในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีนในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าวยังมีการศึกษาไม่มากนัก การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาปริมาณไทอามีนของข้าวในระยะเจริญเต็มที่ และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในเมล็ดที่อยู่ระหว่างการพัฒนา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ข้าวพันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพทางด้านโภชนาการ ซึ่งการพัฒนาพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีปริมาณไทอามีนเพิ่มสูงขึ้นจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาแหล่งพันธุ์ที่ดี เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยให้มีปริมาณไทอามีนเพิ่มมากขึ้นต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดและหาปริมาณไทอามีนในเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวที่ประกอบด้วย lemma และ palea ของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ กข29 กข41 และพิษณุโลก 2 โดยเก็บเมล็ดข้าวในระยะเจริญเต็มที่ (ระยะเก็บเกี่ยว) จำนวน 20 เมล็ด จากนั้นบดให้ละเอียดสกัดไทอามีนด้วยน้ำปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกันด้วยโกร่งที่แช่ในน้ำแข็ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที นำสารละลายส่วนใสกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ไปหาปริมาณไทอามีนด้วย HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Moongngarm and Saetung (2010) ใช้คอลัมน์ C-18 (Infinity Lab Poroshell 120EC-C18, 4.6x150 mm, 4um Agilent) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส 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 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทอามีนไฮโดรคลอไรด์

การสกัดและหาปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวที่ประกอบด้วย lemma และ palea ของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ กข29 กข41 และพิษณุโลก 2 โดยเก็บเมล็ดข้าวใน 4 ระยะ ได้แก่ ระยะดอกบาน ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเจริญเต็มที่ แต่ละระยะเก็บจำนวน 50 เมล็ด จากนั้นนำมาสกัดโปรตีนด้วย 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford's assay โดยใช้สารสะลายส่วนใส 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายแบรดฟอร์ด 1,450 ไมโครลิตร ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ หาปริมาณโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin)

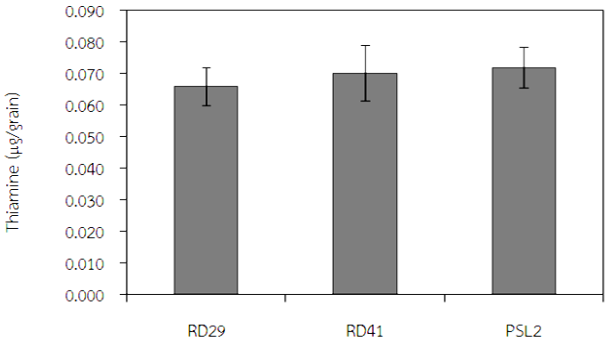
การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase โดยดัดแปลงจากวิธีของ Kawasaki *et al.* (1990) และ Rapala-Kozik *et al.* (2008) ปฏิกิริยาประกอบด้วย 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 3M HCl นำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ปรับ pH ของสารละลายส่วนใสให้เป็น 4.5 ด้วย 4M โซเดียมอะซีเตทจากนั้นทำการเปลี่ยนอนุพันธ์ของไทอามีน (thiamine phosphates) ไปเป็นไทอามีนโดยการเติม 1% takadiastase 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณไทอามีนด้วย HPLC ด้วยวิธีการเดียวกับการหาปริมาณไทอามีนในเมล็ดข้าวที่ดัดแปลงจาก Moongngarm and Saetung (2010)

ผลการวิจัย

ปริมาณไทอามีนในเมล็ดข้าว

การศึกษาปริมาณไทอามีนในเมล็ดข้าวในระยะเก็บเกี่ยวของข้าวพันธุ์ กข29 กข41 และพิษณุโลก 2 พบว่า ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 มีปริมาณไทอามีนมากที่สุด รองลงไปได้แก่ พันธุ์ กข41 และ กข29 ตามลำดับ โดยมีปริมาณไทอามีนเท่ากับ 0.072 0.070 และ 0.068 µg/grain ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าข้าวทั้ง 3 พันธุ์มีปริมาณไทอามีนไม่แตกต่างกัน (P>0.05) (ภาพที่ 2)



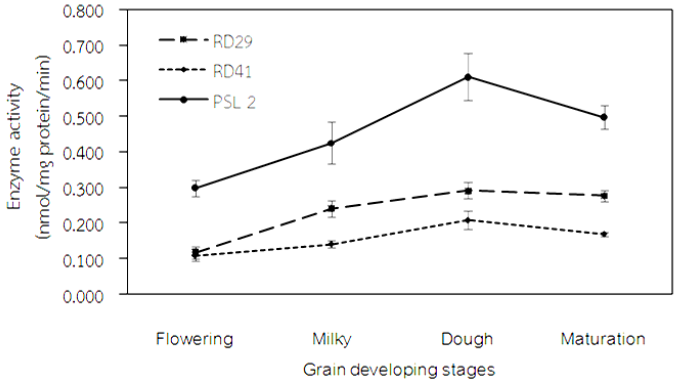
ภาพที่ 2 ปริมาณไทอามีนในข้าวพันธุ์ กข29 กข41 และพิษณุโลก 2 ในระยะเจริญเต็มที่
(แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE)

กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase

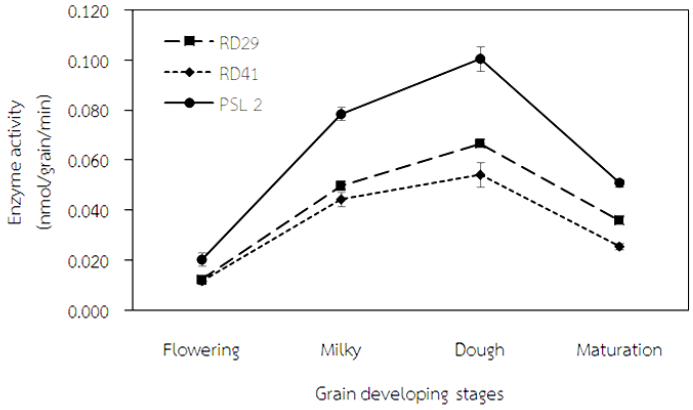
จากการศึกษาอัตราการสังเคราะห์ไทอามีนโดยการทำงานของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในเมล็ดข้าวที่อยู่ระหว่างพัฒนาของเมล็ดทั้ง 4 ระยะ พบว่าเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาพัฒนาเข้าสู่ระยะดอกบานกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มสูงขึ้นและสูงที่สุดในระยะข้าวเม่าจากนั้นลดลงในระยะเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 3) ขณะที่กิจกรรมของ

เอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อเมล็ดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนมและสูงที่สุดในระยะข้าวเม่าจากนั้นลดลงในระยะเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 4) ซึ่งมีแนวโน้มคล้ายคลึงกันในข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ทั้งนี้เมื่อทำการวิเคราะห์พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ในเมล็ดข้าวทั้ง 4 ระยะมีระดับแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละระยะของข้าวแต่ละพันธุ์บนพื้นฐานของกิจกรรมต่อเมล็ดและต่อปริมาณโปรตีน พบว่า ในระยะออกดอก ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่าและระยะเก็บเกี่ยวมีระดับการทำงานของเอนไซม์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เมื่อหาค่าเฉลี่ยการกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในทุกระยะการเจริญของเมล็ดของข้าวพันธุ์ กข41 กข 29 และพิษณุโลก 2 พบว่า มีค่าเฉลี่ยเป็น 0.034 0.041 และ 0.062 nmole/grain/min ตามลำดับ



ภาพที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อปริมาณโปรตีนระหว่างพัฒนาการของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข29 กข41 และพิษณุโลก 2 (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE)



ภาพที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อเมล็ด ระหว่างพัฒนาการของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข29 กข41 และพิษณุโลก 2 (แถบแสดงความคลาดเคลื่อนบนกราฟแสดงค่า standard error; SE)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ข้าวแต่ละพันธุ์มีแนวโน้มมีปริมาณไทอามีนในเมล็ดแตกต่างกัน เป็นไปได้ว่าข้าวพันธุ์ที่มีอัตราการสังเคราะห์ไทอามีนสูงเป็นเพราะความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีน เช่น HET-P synthase, HMPK และ TMP-PPase (Phraprasert, 2015) สามารถทำงานได้มากกว่าพันธุ์ที่มีอัตราการสร้างไทอามีนที่ต่ำกว่า Rapala-Kozik *et al.* (2007) รายงานว่า HMPK/TMP-PPase เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติของสองเอนไซม์ (bi-functional protein) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไทอามีน สามารถสังเคราะห์ไทอามีนโมโนฟอสเฟสได้จากสารตั้งต้น HMP และ HET-P เมื่อมีแมกนีเซียมเป็นโคแฟกเตอร์เช่นเดียวกับโปรตีน BTH1 ที่พบใน *Brassica napus* (Kim *et al.*, 1998) การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ในเมล็ดข้าวที่ระยะการพัฒนา 4 ระยะ พบว่าระยะการพัฒนาของเมล็ดทั้ง 4 ระยะ มีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase แตกต่างกัน โดยเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาหลังจากดอกบานกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ต่อเมล็ดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระยะน้ำนมและมีกิจกรรมสูงที่สุดในระยะข้าวเม่าจากนั้นลดลงในระยะเก็บเกี่ยว เมื่อพิจารณาในข้าวแต่ละพันธุ์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase แตกต่างกัน พันธุ์พิษณุโลก 2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase สูงที่สุดขณะที่พันธุ์ กข41 มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุด ซึ่งข้าวทั้ง 3 พันธุ์มีกิจกรรมเฉลี่ยประมาณ 0.16 nmole thiamine/mg protein/min ใกล้เคียงกับรายงานในต้นกล้าข้าวโพดมีกิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase เท่ากับ 0.22 nmole TMP/mg protein/min (Rapala-Kozik *et al.*, 2007) Belanger *et al.* (1995) และ Phraprasert (2015) กล่าวว่าการสังเคราะห์ไทอามีนจะเกิดมากในช่วงที่เมล็ดมีสีเขียว เนื่องจากพบว่าการสังเคราะห์ไทอามีนเกิดขึ้นใน พลาสติด โดยในระยะน้ำนมและข้าวเม่าพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์และการสะสมไทอามีนสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเมล็ดต้องเร่งสร้างและสะสมไทอามีนให้เพียงพอก่อนเข้าสู่ระยะเก็บเกี่ยวซึ่งเป็นระยะพัก กิจกรรมของเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase ลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมในระยะข้าวเม่า ขณะที่ปริมาณไทอามีนในระยะเก็บเกี่ยวสูงที่สุด เนื่องจากไทอามีนเป็นรูปที่สะสมโดยจับอยู่กับ thiamin-binding protein มีรายงานว่าในข้าวกิจกรรมการจับของไทอามีนจะเพิ่มขึ้นหลังจากดอกบาน 10 วัน และคงที่หลังจากดอกบาน 30 วัน โดยการเพิ่มขึ้นของไทอามีนและการเพิ่มขึ้นของโปรตีนเป็นไปในทางเดียวกัน (Shimizu *et al.*, 1990) การศึกษาคุณสมบัติของ thiamin-binding protein ในชั้นรำของข้าวและเมล็ดบักวีทระบุว่า thiamin-binding protein จำเพาะกับไทอามีนเท่านั้น ไม่สามารถจับกับไทอามีนมอนอฟอสเฟตและไทอามีนไดฟอสเฟตได้ (Mitsunaga *et al.*, 1986; Nishimura *et al.*, 1984) จึงทำให้ในระยะเก็บเกี่ยวพืชจะเปลี่ยนอนุพันธ์ของไทอามีนเป็นไทอามีนสำหรับจัดเก็บในระยะพักตัวและนำไปใช้สำหรับการงอกของเมล็ด (Ampo *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2004) เมื่อเมล็ดดูดน้ำไทอามีนจะถูกเปลี่ยนเป็นไทอามีนไดฟอสเฟตมีบทบาทสำคัญในวิถีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตเพื่อสร้างพลังงานสังเคราะห์น้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม รวมถึงการสร้างสารตัวกลางในวิถีไกลโคไลซีส (Rapala-Kozik, 2011) Golda *et al.* (2004) พบว่า ในธัญพืชปริมาณไทอามีนจะเริ่มลดลงเมื่อเมล็ดงอก 3 วัน และในพืชตระกูลถั่วจะเริ่มลดลงเมื่อเมล็ดงอก 6 วัน ขณะที่ปริมาณไทอามีนไดฟอสเฟตเพิ่มสูงขึ้น Rapala-Kozik *et al.* (2009) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ TMP-PPase และ TPK สูงขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเมล็ดข้าวโพดดูดน้ำได้ 5 วัน จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความผันแปรของไทอามีนและกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว ซึ่งเป็นไปได้ว่าหากสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ให้สูงขึ้นอาจมีโอกาสทำให้ปริมาณไทอามีนที่สะสมใน

เมล็ดสูงขึ้นได้ นอกจากนี้ความผันแปรของไทอามีนยังเกิดได้จากปัจจัยอื่น ๆ เช่น สภาพแวดล้อมในการปลูก (Goyer & Haynes, 2011; Witten & Aulrich, 2018) และความเครียดจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น NaCl และความแล้ง เป็นต้น (Rapala-Kozik *et al*., 2008) ดังนั้นการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ อาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำไปสู่ความก้าวหน้าในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณไทอามีนในเมล็ดเพิ่มขึ้นเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับข้าวไทยต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ปริมาณไทอามีนในข้าวพันธุ์ กข29 กข41 และพิษณุโลก 2 มีแนวโน้มแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเอนไซม์ HMPK/TMP-PPase มีกิจกรรมแตกต่างกันไปในแต่ละระยะการพัฒนาของเมล็ด โดยมีกิจกรรมมากที่สุดในระยะข้าวเม่า ซึ่งเป็นระยะที่มีการพัฒนาของคลอโรพลาสต์ และเมื่อเมล็ดเข้าสู่ระยะเก็บเกี่ยวจะมีกิจกรรมของเอนไซม์นี้ลดลง

เอกสารอ้างอิง

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

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

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.

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.

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*(14-15), 1615-1624.

Goyer, A., & Haynes, K. G. (2011). Vitamin b1 content in potato: Effect of genotype, tuber enlargement, and storage, and estimation of stability and broad-sense heritability. *American Journal of Potato Research, 88*(4), 374-385.

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

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

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.

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

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.

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

Phraprasert, P. (2015). The role of thiamine (vitamin b1) in plants. *Burapha Science Journal, 20*(2), 221-231.

Rapala-Kozik, M. (2011). Vitamin B-1 (Thiamine): A cofactor for enzymes involved in the main metabolic pathways and an environmental stress protectant. *Biosynthesis of Vitamins in Plants: Vitamins a, B1, B2, B3, B5, Pt A, 58*, 37-91.

Rapala-Kozik, M., 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.

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.

Smith, T.J., Johnson, C.R., Koshy, R., Hess, S.Y., Qureshi, U.A., Mynak, M.L., & Fischer, P.R. (2020). Thiamine defficiency disorder: a clinical perspective. Annals of the New York Academy of Sciences. doi: 10.1111/nyas.14536.

Verma, D.K. & Srivastrav, P.P. (2020). Bioactive compounds of rice (*Oryza sativa* L.): Review on paradigm and its potential benefit in human health. *Trends in Food Science & Technology, 97,* 355–365

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.

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.