โปรไฟล์กรดอะมิโนรวมและกรดอะมิโนอิสระในข้าว 4 พันธุ์

Total and Free Amino Acid Profiles in Four Rice Cultivars

ขนิษฐา แก้วสงค์[1], ศิริพร ศรีภิญโญวณิชย์[2], ธนภูมิ ศิริงาม[3] และ วาสินี พงษ์ประยูร[1*]

Khanittha Kaewsong[1], Siriporn Sripinyowanich[2], Thanapoom Siringam[3] and Wasinee Pongprayoon[1*]

[1]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[2]*ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*

[3]*สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร*

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

[2]*Botany Department, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University*

[3]*Agriculture Department, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University*

Received : 12 June 2018

Accepted : 18 August 2018

Published online : 10 September 2018

บทคัดย่อ

กรดอะมิโนรวมและกรดอะมิโนอิสระบ่งชี้ถึงคุณค่าทางโภชนาการและการเปลี่ยนแปลงของเมตาโบไลท์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมี (โปรตีน แป้ง และน้ำตาลรีดิวซ์) ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนรวมและกรดอะมิโนอิสระด้วย GC-MS ในเมล็ดข้าว 4 พันธุ์ ได้แก่ ขาวบ้านนา 432 กข45 ปราจีนบุรี 1 และปราจีนบุรี 2 พบว่า ข้าวพันธุ์ กข 45 มีโปรตีนมากที่สุด 8.72 g/100 g รองลงมาคือข้าวพันธุ์ปราจีนบุรี 2 (8.45 g/100 g) ขาวบ้านนา 432 (7.60 g/100 g) และปราจีนบุรี 1 (7.53 g/100 g) แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติของปริมาณแป้งและน้ำตาลรีดิวซ์ พบกรดอะมิโนรวม 7 ชนิด ที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ((p<0.05) ได้แก่ วาลีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน โพรลีน กรดกลูตามิค กรดแอสปาร์ติคและฟีนิลอะลานิน โดยที่ข้าวพันธุ์ขาวบ้านนา 432 กข45 และปราจีนบุรี 2 มีปริมาณลิวซีนและกรดกลูตามิคเฉลี่ย 0.74 และ 1.55 g/100 g ส่วนกรดอะมิโนอิสระ ในข้าวพันธุ์ขาวบ้านนา 432 มีปริมาณแอสพาราจีนและกาบามากที่สุด (22.46 และ 11.61 mg/100 g) จากผลการทดลอง ทำให้ได้ข้อมูลในด้านโภชนาการเพิ่มเติมของโปรไฟล์กรดอะมิโนในข้าวขึ้นน้ำและข้าวน้ำลึกซึ่งเอื้อต่อการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ข้าวที่มีคุณภาพสูง

คำสำคัญ : โปรไฟล์, กรดอะมิโนรวม, กรดอะมิโนอิสระ, ข้าว

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

Abstract

Total amino acids (hydrolyzed amino acids) and free physiological amino acids indicate nutritional values and metabolic changes. This research aimed to study in four rice cultivars such as Khao Ban Na 432, RD45, Prachin Buri 1 and Prachin Buri 2 in terms of their chemical compositions (protein, starch, and reducing sugar). Total amino acids and free physiological amino acids were investigated using GC-MS. Results showed that RD45 had a protein content at 8.72 g/100g followed by Prachin Buri 2 (8.45 g/100g), Khao Ban Na 432 (7.60 g/100g) and Prachin Buri 1 (7.53 g/100g). However, there were no significant differences in starch and reducing sugar contents. Seven amino acids (Val, Leu, Ile, Pro, Glu, Asp and Phe) were significantly different ($p < 0.05$). The average Leu and Glu contents of Khao Ban Na 432, RD45 and Prachin Buri 2 were 0.74 and 1.55 g/100g, respectively. For free amino acids, it was noted that Khao Ban Na 432 contained the highest levels of Asn and GABA (22.46 and 11.61 mg/100g). These results provide a valuable addition to the nutrition database of amino acid profiles of floating and deepwater rice cultivars and could contribute to breeding high quality rice.

Keywords : profile, total amino acid, free amino acid, rice

บทนำ

ประเทศไทยมีการเพาะปลูกข้าวหลากหลายพันธุ์ จำแนกตามสภาพพื้นที่ปลูก ได้เป็น ข้าวไร่ (upland rice) ข้าวนาสวน (lowland rice) ข้าวขึ้นน้ำ (floating rice) หรือข้าวนาเมืองหรือข้าวฟางลอย และข้าวน้ำลึก (deepwater rice) ซึ่งเป็นข้าวที่สามารถปลูกในพื้นที่น้ำท่วม มีการเพาะปลูก 0.52 ล้านเฮกตาร์หรือคิดเป็น 5.78 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เพาะปลูกข้าวในประเทศไทย พบบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยาและบางปะกง โดยเฉพาะในจังหวัดปราจีนบุรีและนครนายก ข้าวขึ้นน้ำสามารถเจริญเติบโตได้ดีและยังคงให้ผลผลิตเมื่อปลูกในสภาพน้ำลึกตั้งแต่ 1-5 เมตร เป็นเวลา 3-4 เดือน ข้าวชนิดนี้มีลักษณะพิเศษคือมีความสามารถในการยืดปล้องโดยที่ความสูงของต้นข้าวสามารถเปลี่ยนแปลงตามระดับน้ำ ได้แก่ ข้าวพันธุ์เล็บมือนาง 111 พลายงามปราจีนบุรี ปิ่นแก้ว และขาวบ้านนา 432 ส่วนข้าวน้ำลึกเป็นข้าวพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและยังคงให้ผลผลิตเมื่อปลูกในสภาพน้ำลึกตั้งแต่ 50 ถึง 100 เซนติเมตร ได้แก่ ปราจีนบุรี 1 ปราจีนบุรี 2 และอยุธยา 1 (Hirano *et al*., 2014) แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งข้าวขึ้นน้ำและข้าวน้ำลึกยังคงให้ผลผลิตต่ำ คุณภาพการหุงต้ม ร่วน แข็ง เกษตรกรส่วนใหญ่ไม่นิยมบริโภคโดยตรง

ข้าวเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญของมนุษย์ ในเมล็ดข้าวมีโปรตีน 7-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Jiang *et al*., 2014) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อคุณภาพการหุงต้มและรับประทาน และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของข้าว เช่น สมบัติการละลาย การดูดซับไขมัน การเกิดฟองและการยับยั้งอนุมูลอิสระ (Zhou *et al*., 2002; Mahasing *et al*., 2013) ข้าวที่มีโปรตีนสูง ส่งผลให้ระยะเวลาการหุงต้มนานขึ้นและเมล็ดข้าวแกร่งขึ้นทำให้ขัดสียาก ความแข็งของข้าวหุงสุกสูงและความเหนียวของข้าวลดลง (Juliano, 1972) การศึกษาวิจัยเพื่อหาคุณค่าทางโภชนาการของข้าวที่ผ่านมานั้น มุ่งเน้นวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของข้าว ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เส้นใยอาหาร เถ้า วิตามิน และแร่ธาตุ และการศึกษาของโปรตีนในเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์นั้นถูกจำกัดอยู่ที่การวัดปริมาณโปรตีน (Rujirapisit *et al*., 2012) และชนิดของโปรตีนที่สะสมอยู่ในเมล็ดข้าว (Balindong *et al*.,

2018) ซึ่งยังไม่ได้คำนึงถึงรูปแบบของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในเมล็ดข้าวโดยเฉพาะกรดอะมิโนที่อยู่ในรูปโปรตีน (protein / peptide bound amino acid) ซึ่งมีบทบาทในเชิงโภชนาการ เนื่องจากโปรตีนจากข้าวเป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่จำเป็นและจัดเป็นสารอาหารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ต่ำ (Mahasing *et al*., 2013) ในข้าวกล้องประกอบด้วยกรดอะมิโนรวม 78 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็น 36 เปอร์เซ็นต์และกรดอะมิโนชนิด branched-chain ได้แก่ ลิวซีน (leucine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) และวาลีน (valine) 18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งช่วยกระตุ้นการสร้างโปรตีนในกล้ามเนื้อ และอาจช่วยลดการสลายกล้ามเนื้อ (Kalman *et al*., 2014) นอกจากนี้ การวิเคราะห์หากรดอะมิโนอิสระ (free physiological amino acid) ที่อยู่ใน physiological fluid นั้นมีความสำคัญในกระบวนการด้านสรีรวิทยา การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นกรดอะมิโนมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ซึ่งมีผลต่อคุณค่าสารอาหาร ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมตลอดจนผลกระทบทางด้านพันธุกรรม นอกจากกรดอะมิโนมาตรฐาน 20 ชนิด ยังมีกรดอะมิโนชนิดอื่นที่มีบทบาทสำคัญทางสรีรวิทยา เช่น ไฮดรอกซิโพรลีน (hydroxyproline) ทำหน้าที่ควบคุมโปรตีนและกาบา (gamma-aminobutyric acid; GABA) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท (Filee *et al*., 2013) ทั้งนี้ ความหลากหลายของข้าวแต่ละพันธุ์นับได้ว่าเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ข้าว ซึ่งมีความแตกต่างกันทางด้านสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของเมล็ดข้าว อาจส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของข้าว โดยเฉพาะชนิดและปริมาณกรดอะมิโน ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้มีเป้าหมายในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวเบื้องต้น ได้แก่ โปรตีน แป้ง น้ำตาลรีดิวส์ รวมทั้งการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนรวมและกรดอะมิโนอิสระด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าว (germplasm) เพิ่มเติมร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าว เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและสร้างเอกลักษณ์เฉพาะในข้าวขึ้นน้ำและข้าวน้ำลึก และเอื้อประโยชน์สำหรับนักปรับปรุงพันธุ์พืชที่ต้องการผลิตพันธุ์ข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงโดยเฉพาะกรดอะมิโนให้เพิ่มมากขึ้นในเมล็ด

วิธีดำเนินการวิจัย

พืชที่ใช้ทดลอง

เมล็ดข้าว 4 พันธุ์ ได้แก่ ขาวบ้านนา 432 กข45 ปราจีนบุรี 1 และปราจีนบุรี ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ขึ้นน้ำและข้าวน้ำลึกที่ปลูกมากในภาคตะวันออกของไทย มีการนำมาแปรรูปเพื่อการบริโภค และข้าวเหล่านี้ยังมีศักยภาพในการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ภาวะน้ำท่วม รวมทั้งภาวะแล้งและดินเค็มซึ่งเกิดในบางช่วงของการเพาะปลูก โดยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีประวัติพันธุ์ ชนิดข้าวและลักษณะเด่นของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประวัติ ชนิดข้าวและลักษณะเด่นของข้าว 4 พันธุ์ (Bureau of Rice Research and Development, 2018)

พันธุ์รับรอง	พันธุ์บริสุทธิ์	ชนิดข้าว	ลักษณะเด่น
ขาวบ้านนา 432 (Khao Ban Na 432)	PCRC92001-432	ข้าวเจ้า ข้าวขึ้นน้ำ ไวต่อช่วงแสง	- ให้ผลผลิตเฉลี่ย 449 กิโลกรัมต่อไร่ - เมล็ดข้าวมีคุณสมบัติเหมาะสำหรับแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เส้น
กข45 (RD45)	PCR89151-27-9-155	ข้าวเจ้า ข้าวน้ำลึก ไวต่อช่วงแสง	- ให้ผลผลิตเฉลี่ย 520 กิโลกรัมต่อไร่ - คุณภาพการสีดีมาก คุณภาพหุงต้มรับประทานดี ข้าวสุกนุ่มเหนียวและมีกลิ่นหอม
ปราจีนบุรี 1 (Prachin Buri 1)	SPR'76 Com3-5-2	ข้าวเจ้า ข้าวน้ำลึก ไวต่อช่วงแสง	- ให้ผลผลิตเฉลี่ย 450 กิโลกรัมต่อไร่ - แปรรูปเป็นเส้นก๋วยเตี๋ยว ขนมจีนและแป้งได้ดี
ปราจีนบุรี 2 (Prachin Buri 2)	HTAFR81042-4B-7-1	ข้าวเจ้า ข้าวน้ำลึก ไวต่อช่วงแสง	- ให้ผลผลิตเฉลี่ย 846 กิโลกรัมต่อไร่ในสภาพที่มีระดับน้ำมากกว่าปกติ (100 เซนติเมตร) - สามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เส้น เช่น เส้นหมี่ เส้นขนมจีน เส้นก๋วยเตี๋ยว

การวางแผนการทดลอง การเตรียมตัวอย่างข้าว และการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยการสุ่มจากตัวอย่างเมล็ดข้าวทั้งหมด 1,000 กรัม มาจำนวน 500 เมล็ด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด (น้ำหนักข้าวประมาณ 2,500 มิลลิกรัม) บดตัวอย่างข้าวแต่ละซ้ำให้ละเอียดและแบ่งเพื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าว ได้แก่ โปรตีน แป้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และกรดอะมิโน และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลในข้าวแต่ละพันธุ์ โดยใช้วิธี Tukey ด้วยโปรแกรม Minitab (เวอร์ชัน 18) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p< 0.05$)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวกล้อง

1. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดละเอียดแล้วจำนวน 200 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ตามวิธี AOAC Kjeldahl (Kjeldahl,1883)

2. วิเคราะห์ปริมาณแป้ง

นำเมล็ดข้าวกล้องที่บดละเอียดแล้วจำนวน 100 มิลลิกรัม วิเคราะห์หาแป้งโดยใช้ชุดทดสอบ K-TSTA-100A (Megazyme, Ireland) ด้วยวิธี amyloglucosidase/alpha amylase วิเคราะห์ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ค่าการดูดกลืนแสง 510 นาโนเมตร

3. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ตามวิธีของ Thitisaksakul *et al*. (2015)

ชั่งตัวอย่างเมล็ดข้าวที่ถูกบดละเอียดแล้วจำนวน 500 มิลลิกรัม สกัดน้ำตาลจากตัวอย่างเมล็ดข้าวด้วยการต้มในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ นำตะกอนที่ได้มาละลายน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS method)

4. วิเคราะห์กรดอะมิโนรวม (total amino acids) จากตัวอย่างผ่านการไฮโดรไลซ์ (rice protein hydrolysate) และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ตามวิธีของ Jimenez-Martín *et al*. (2012)

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่บดละเอียดแล้วมาจำนวน 100 มิลลิกรัม นำตัวอย่างใส่ในหลอดขนาด 10 มิลลิลิตร และทำการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ถูกย่อยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที แบ่งส่วนใสที่ได้ 100 ไมโครลิตร นำมาทำให้เป็นกลางและผ่าน solid phase extraction (SPE) และทำปฏิกิริยา ตามขั้นตอนของชุดทดสอบ EZ- Faast (Phenomenex, USA)

5. วิเคราะห์หากรดอะมิโนอิสระ (free amino acids) และปริมาณกาบา (GABA) ตามวิธีของ Jimenez-Martín *et al*. (2012)

ชั่งเมล็ดข้าวกล้องที่ถูกบดละเอียดแล้วจำนวน 100 มิลลิกรัม เติมอะซีโตไนไตรล์ 25 เปอร์เซ็นต์ ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไป sonicate เป็นเวลา 20 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผ่าน solid phase extraction (SPE) และทำปฏิกิริยา ตามขั้นตอนของชุดทดสอบ EZ-Faast (Phenomenex, USA) และวิเคราะห์ด้วย GC-MS

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ปริมาณโปรตีน แป้งและน้ำตาลรีดิวซ์ในข้าว 4 พันธุ์

จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวกล้องทั้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ ขาวบ้านนา 432 กข45 ปราจีนบุรี 1 และปราจีนบุรี 2 พบว่า ข้าวพันธุ์ กข45 และปราจีนบุรี 2 มีปริมาณโปรตีน 8.72 และ 8.45 g/100 g ตามลำดับ สูงกว่าในข้าวพันธุ์ขาวบ้านนา 432 และปราจีนบุรี 1 ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 7.60 และ 7.53 g/100 g ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณแป้งและน้ำตาลรีดิวซ์ในข้าวทั้ง 4 พันธุ์ (ตารางที่ 2) ทั้งนี้โปรตีนในข้าวมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว และโดยทั่วไปจะมีปริมาณน้อยกว่าในธัญพืชชนิดอื่น (Balindong *et al*., 2018) โปรตีนมีมากใน sub-aleurone layers ใน aleurone cells (Azhakanandam *et al*., 2000) โปรตีนในข้าวกล้องมีปริมาณ 6.6-7.3% โดยสามารถจำแนกตามความสามารถในการละลายได้ 4 ชนิด คือ albumin (9.7-14.2%, ละลายน้ำ), globulin (13.5-18.9%, ละลายในเกลือ) prolamin (3.0-5.4%, ละลายในแอลกฮอล์) และ glutelin (63.8-73.4%, ละลายในด่าง) (Zhou *et al*., 2002) นอกจากนี้ในด้านคุณภาพการหุงต้ม นอกจากปริมาณของอะไมโลส (amylose) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญในคุณภาพการหุงต้มแล้ว โปรตีนยังเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่มีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวหุงสุกและระยะเวลาในการหุงต้มอีกด้วย ซึ่งโปรตีนเป็นตัวขัดขวางการซึมของน้ำเข้าไปภายในเมล็ดข้าวหรือไปขัดขวางการพองตัวของเม็ดแป้ง (starch granule) เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งช่วยเพิ่มการยึดเกาะระหว่างโปรตีนและเพิ่มความแข็งแรงให้กับเม็ดแป้ง โดยข้าวที่มีปริมาณโปรตีนสูงมีความแข็งของข้าวหุงสุกสูงแต่ความเหนียวของข้าวลดลงรวมทั้งระยะเวลาในการหุงต้มนานขึ้น (Balindong *et al*.,

2018) จากผลการทดลอง พบปริมาณโปรตีนในข้าวทั้ง 4 พันธุ์โดยเฉลี่ยที่ 8.00 g/100 g โดยข้าวพันธุ์ กข 45 และปราจีนบุรี 2 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์น้ำลึกที่มีปริมาณโปรตีนสูง 8.72 และ 8.45 g/100 g ซึ่งมากกว่าที่พบในข้าวเหนียวดำและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 8.00 และ 7.90 g/100 g ตามลำดับ (Rujirapisit *et al*., 2012; Wiset, 2012) ชี้ให้เห็นว่านอกจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวหอมที่นิยมรับประทานแล้ว ยังมีข้าวน้ำลึกพันธุ์ กข45 ที่มีความหอม ให้ผลผลิตสูง (ตารางที่ 1) ปลูกได้ในบริเวณที่มีน้ำท่วมและยังมีปริมาณโปรตีนสูงอีกด้วย

ตารางที่ 2 ปริมาณ โปรตีน แป้ง และน้ำตาลรีดิวซ์ ในข้าว 4 พันธุ์

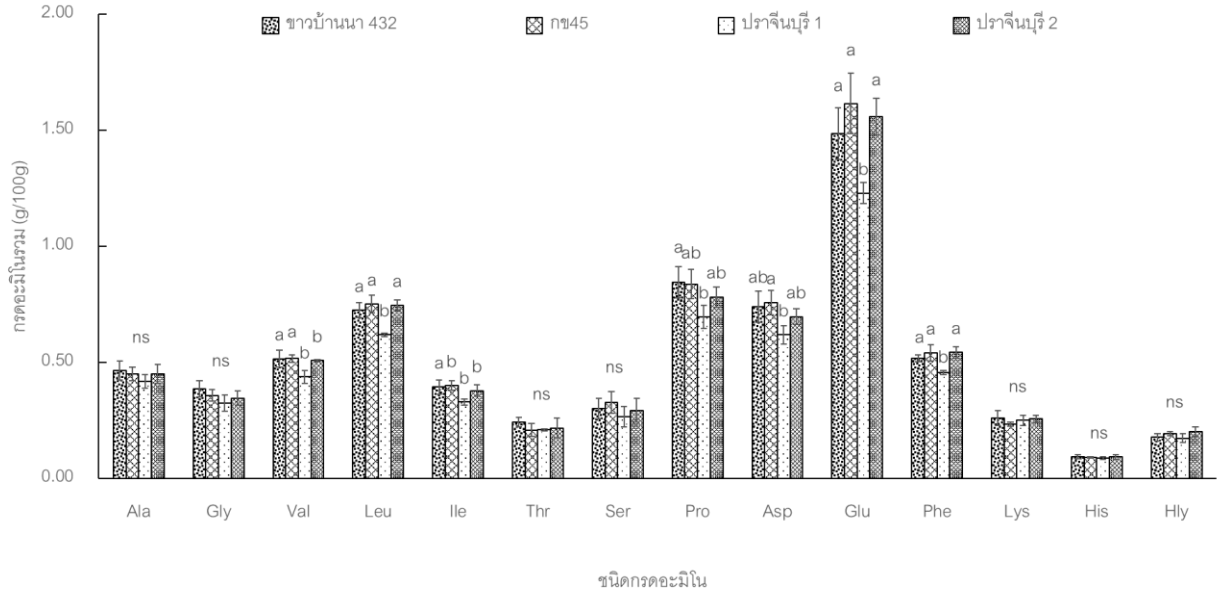
พันธุ์	โปรตีน (g/100 g)	แป้ง (g/100 g)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g glucose/100 g)
ขาวบ้านนา 432	7.60±0.15[b]	65.02±1.92[a]	0.99±0.18[a]
กข45	8.72±0.26[a]	70.05±1.28[a]	1.17±0.15[a]
ปราจีนบุรี 1	7.53±0.29[b]	69.60±5.85[a]	0.85±0.24[a]
ปราจีนบุรี 2	8.45±0.17[a]	66.09±5.05[a]	1.09±0.10[a]
เฉลี่ย	8.08±0.60	67.69±2.51	1.03±0.14
CV (%)	7.43	3.71	13.46

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ตามวิธีของ Tukey ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± standard deviation (SD)

ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนรวม (total amino acids)

การวิเคราะห์กรดอะมิโนรวมจากตัวอย่างข้าวผ่านการไฮโดรไลซ์ อยู่ในรูป protein/ peptide bound amino acids ด้วยเครื่อง GC-MS เพื่อศึกษาหาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่สำคัญในเชิงโภชนาการในข้าวขึ้นน้ำและข้าวน้ำลึก พบกรดอะมิโนรวมจำนวน 14 ชนิด มีปริมาณของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันทางสถิติจำนวน 7 ชนิด ในข้าว 4 พันธุ์ แบ่งได้เป็น กรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acids) 4 ชนิด ได้แก่ วาลีน (valine; Val) ลิวซีน (leucine; Leu) ไอโซลิวซีน (isoleucine; Ile) และฟีนีลอะลานีน (phenylalanine; Phe) โดยลิวซีนมีปริมาณโดยเฉลี่ยที่ 0.74 g/100g ในข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ ขาวบ้านนา 432 กข45 และปราจีนบุรี 2 และพบกรดอะมิโนไม่จำเป็น (non-essential amino acids) 3 ชนิด ได้แก่ โพรลีน (proline; Pro) กรดแอสปาร์ติค (aspartic acid; Asp) และกรดกลูตามิค (glutamic acid; Glu) โดยกรดกลูตามิคมีปริมาณมากที่สุด 1.62 g/100 g ในข้าวพันธุ์ กข45 ในขณะที่ข้าวพันธุ์ปราจีนบุรี 1 มีปริมาณลิวซีน กรดกลูตามิคและฟีนีลอะลานีนต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวอีก 3 พันธุ์ (ภาพที่ 1) เห็นได้ว่าข้าวขาวบ้านนา 432 กข 45 และปราจีนบุรี 2 นอกจากมีปริมาณโปรตีนสูงแล้ว ยังมีกรดอะมิโนจำเป็นสูงอีกด้วย โดยเฉพาะลิวซีนที่มีบทบาทในการเป็นตัวส่งสัญญาณและเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกล้ามเนื้อ เป็นตัวส่งสัญญาณใน mammalian target of rapamycin (mTOR) เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนในกล้ามเนื้อและในเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) และทำหน้าที่ควบคุม mTOR ในการตอบสนองของร่างกายเมื่อรับประทานอาหารที่มีโปรตีนสูงเข้าไปและยังช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Li *et al*., 2011) การศึกษาทางด้านโปรตีนในต้น *Arabidopsis thaliana* แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่อยู่ในรูปโปรตีน (protein-bound amino acids) มีประมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบสด และมีปริมาณของลิวซีนมากที่สุด (9.2%) แต่มีทริปโตเฟนน้อยที่สุด

(1.2%) (Hidebrandt *et al*., 2015) และมีรายงานว่าในข้าวหุงสุกมีปริมาณลิวซีนมากที่สุด 214 mg/100 g รองลงมา คือ วาลีน ฟีนีลอะลานีน และ ไอโซลิวซีน ที่ 151,133 และ 109 mg/100 g ตามลำดับ (Kalman, 2014) นอกจากนี้ กรดกลูตามิคซึ่งเป็นกรดอะมิโนไม่จำเป็นมีบทบาทสำคัญในการเป็นสารสื่อประสาท ซึ่งช่วยในการทำงานของสมอง (Garattini *et al*., 2000) พบปริมาณมากในเมล็ดข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ยกเว้นในข้าวพันธุ์ปราจีนบุรี 1 (ภาพที่ 1) มีการศึกษาหากรดอะมิโนรวมในข้าวปลูก (*Oryza sativa* L.) และข้าวป่า (*Oryza glumaepatula*) พบว่ามีกรดอะมิโนรวมจำนวน 18 ชนิดโดยที่มีกรดกลูตามิคปริมาณมากที่สุดในข้าวปลูก 2.35 g/100 g และในข้าวป่า 1.81 g/100 g ตามลำดับ (Santos *et al*., 2013) มีรายงานว่าโปรตีนในเมล็ดข้าวยังขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิดหรือมีปริมาณต่ำ ได้แก่ ไลซีน ทริปโตเฟน โดยเฉพาะเมไทโอนิน (Nguyen *et al*., 2012) จากการทดลองครั้งนี้ ไม่พบเมไทโอนินในข้าวทั้ง 4 พันธุ์ (LOD = 5 nmol/ml: LOQ = 10 nmol/ml) และมีปริมาณของไลซีนต่ำโดยเฉลี่ยที่ 0.25 g/100 g

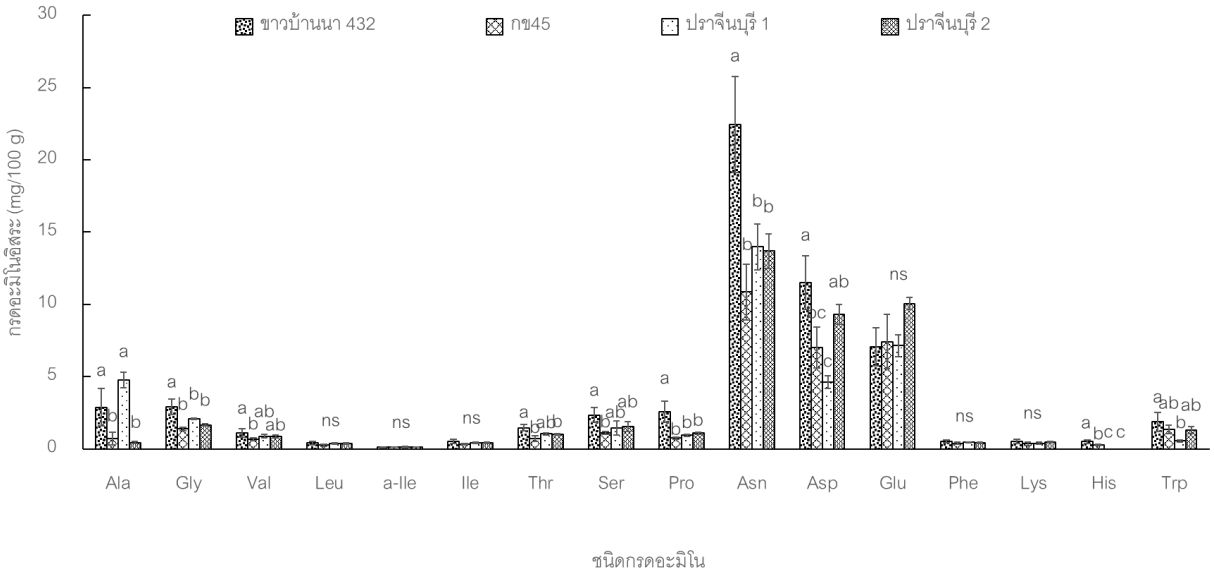


ภาพที่ 1 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนรวมในเมล็ดข้าว 4 พันธุ์, ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± standard deviation (SD)

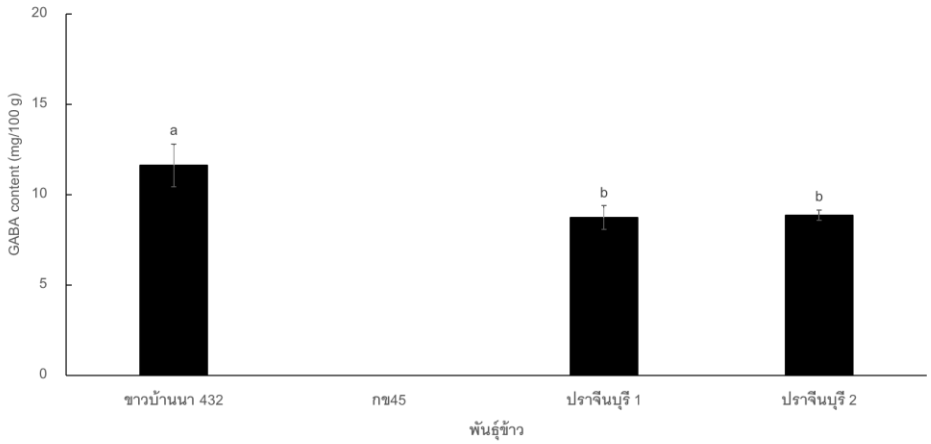
ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) และกาบา (GABA)

จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนอิสระ โดยพบทั้งหมด 16 ชนิด มีกรดอะมิโนจำนวน 10 ชนิดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ อะลานีน (alanine; Ala) ไกลซีน (glycine; Gly) วาลีน ธรีโอนีน (threonine; Thr) ซีรีน (serine; Ser) โพรลีน แอสพาราจีน (asparagine; Asn) กรดแอสปาร์ติค ฮิสทิดีน (histidine; His) และทริปโทเฟน (tryptophan; Trp) ทั้งนี้ พบปริมาณของแอสพาราจีนมากที่สุดคือ 22.46 mg/100 g ในข้าวพันธุ์ขาวบ้านนา 432 รองลงมา ได้แก่ กรดแอสปาร์ติค ไกลซีนและโพรลีนที่ 11.52, 2.92 และ 2.55 mg/100 g ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวอีก 3 พันธุ์ โดยที่ข้าวพันธุ์ กข45 มีปริมาณแอสพาราจีนต่ำที่สุด 10.87 mg/100 g (ภาพที่ 2) นอกจากนี้ ในข้าวพันธุ์ขาวบ้านนา 432 พบปริมาณกาบามากที่สุด 11.61 mg/100 g ซึ่งมีปริมาณกาบามากกว่า 1.3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับที่พบในข้าวปราจีนบุรี 1 และปราจีนบุรี 2 แต่ไม่พบ

กาบาในข้าวพันธุ์ กข45 (ภาพที่ 3) ทั้งนี้ปริมาณกาบาในข้าวพันธุ์ขาวข้าวนา 432 จากงานวิจัยนี้มีปริมาณมากกว่าเกือบ 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับที่พบในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 ที่มีปริมาณกาบา 4.04 และ 3.62 mg/100 g ตามลำดับ (Karladee & Suriyoug, 2012) โดยทั่วไปกรดอะมิโนอิสระมีปริมาณน้อยกว่ากรดอะมิโนรวมหรือกรดอะมิโนที่อยู่ในรูปโปรตีน (protein-bound amino acid) มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 100 ถึง 1,000 เท่า แต่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและแต่ละระยะของการพัฒนา ซึ่งจำเป็นในการสร้างและสลายโปรตีน เกี่ยวข้องกับ metabolic pathway ต่างๆ และ signal transduction pathway (Hildebrandt *et al*., 2015) โดยที่พบปริมาณแอสพาราจีน กรดแอสปาร์ติคและกรดกลูตามิคมากที่สุด ซึ่งกรดอะมิโน 3 ชนิดนี้ถูกใช้เป็นแหล่งสะสมไนโตรเจนและเป็นกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ในการขนส่งหรือลำเลียงในเนื้อเยื่อลำเลียง (sink tissue) โดยที่แอสพาราจีนเปลี่ยนไปเป็นกรดแอสปาร์ติคได้ ทั้งนี้ปริมาณกาบาที่ตรวจพบมากที่สุดในข้าวพันธุ์ข้าวบ้านนา 432 เป็นไปได้ว่ามาจากการเปลี่ยนของโพรลีนผ่านทาง 1-pyrroline-5-caboxylate (P5C) ไปเป็นกรดกลูตามิคและกาบา ตามลำดับ (Biancucci *et al*., 2015; Hidebrandt *et al*., 2015) มีรายงานความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาในหลอดทดลองในการเปลี่ยนจากโพรลีนไปเป็นกาบาภายใต้ภาวะเครียดในพืชโดยผ่าน non-enzymatic reaction (Signorelli *et al*., 2015) ทั้งนี้โพรลีนเป็นสารออสโมไลท์ที่ช่วยในการปรับค่าศักย์ของน้ำในพืชให้ต่ำลงโดยไม่ทำให้ความเต่งของเซลล์ลดลงเพื่อตอบสนองต่อภาวะความเครียดโดยเฉพาะความเค็มหรือความแล้ง (U-bonrat *et al*., 2017) การศึกษา metabolic pathway การให้กาบาจากภายนอก ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ทำให้มีการสะสมของกรดอะมิโนเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ กรดกลูตามิค กรดแอสปาร์ติค อะลานีน ธรีโอนีน ซีรีน และวาลีน ภายใต้ภาวะเครียดจากความร้อน (heat stress) ในต้น creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) (Li *et al*., 2017) และมีการประยุกต์ใช้สารกาบาก่อนได้รับภาวะเครียดจากความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในใบข้าวโพด พบว่ากาบาไปช่วยลดความเสียหายที่เกิดกับเยื่อหุ้มเซลล์ และเพิ่มปริมาณของโพรลีนและน้ำตาล (Wang *et al*., 2017) นอกจากนี้ กาบามีบทบาทสำคัญในทางสรีรวิทยาและมีการสะสมเพิ่มมากขึ้นจำนวนมากกว่ามิลลิโมลาร์ในเนื้อเยื่อภายใต้ภาวะเครียด โดยทั่วไปกาบาทำหน้าที่ควบคุม pH ภายในเซลล์และควบคุมสมดุลของน้ำ เป็นสารต่อต้านแมลง และตัวส่งสัญญาณ (signaling) รวมทั้งช่วยรักษาสมดุลของคาร์บอนและไนโตรเจนเมื่อพืชอยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสม (Hildebrandt *et al*., 2015)



ภาพที่ 2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระในเมล็ดข้าว 4 พันธุ์, ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± standard deviation (SD)



ภาพที่ 3 ปริมาณกาบา (GABA) ในเมล็ดข้าว 4 พันธุ์ ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± standard deviation (SD)

สรุปผลการวิจัย

ข้าวขึ้นน้ำและข้าวน้ำลึก ทั้ง 4 พันธุ์ นอกจากมีประโยชน์ในการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เส้น จากการวิจัยครั้งนี้ยังพบกรดอะมิโนรวมจากตัวอย่างข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งบ่งชี้ความสำคัญในด้านโภชนา การ จำนวน 14 ชนิด โดยพบกรดอะมิโนรวม 7 ชนิดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในข้าว 4 พันธุ์ แบ่งได้เป็น กรดอะมิโนจำเป็น 4 ชนิดและกรดอะมิโนไม่จำเป็นต่อร่างกาย 3 ชนิด โดยมีปริมาณลิวซีนและกรดกลูตามิคมากที่สุดในข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ ขาวบ้านนา 432 กข45 และปราจีนบุรี 2 และพบกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดจำนวน 16 ชนิด มีเพียง 10 ชนิดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพบแอสพาราจีนมากที่สุดที่ 22.46 mg/100 g รองลงมาคือ กรดแอสปาร์ติค ในข้าว

พันธุ์ขาวบ้านนา 432 และพบปริมาณกาบาสูงที่สุด 11.61 mg/100 g ชี้ให้เห็นว่า ข้าวพันธุ์ขาวบ้านนา 432 เป็นข้าวพันธุ์ขึ้นน้ำที่มีศักยภาพนอกจากปลูกในภาวะน้ำท่วมได้ดีแล้ว ยังมีปริมาณกรดอะมิโนรวมและกรดอะมิโนอิสระสูงโดยเฉพาะสารกาบา ซึ่งสร้างเอกลักษณ์เฉพาะให้กับข้าวพันธุ์นี้ และเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ที่ต้องการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในเมล็ดข้าวให้มีกรดอะมิโนสูง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากโครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่สัญญา 24/2559 และทุนสนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษา สำหรับนิสิตระดับปริญญาโท ของนางสาวขนิษฐา แก้วสงค์ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และขอขอบพระคุณ ดร. อติกร ปัญญา ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเทคนิค GC-MS ในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Azhakanandam, K., Power, J. B., Lowe, K.C., Cocking, E.C., Tongdang, T., Jumel, K., Bligh, H.F.J., Harding, S.E., & Davey, M.R. (2000). Qualitative assessment of aromatic indica rice (*Oryza sativa* L.): proteins, lipids and starch in grain from somatic embryo- and seed-derived plants. *Journal of Plant Physiology*, *156* (5-6), 783-789.

Balindong, J.L., Ward, R.M., Liu, L., Rose, T. J., Pallas, L.A., Ovenden, B.W., Snell, P.J., & Water, D.L.E. (2018). Rice grain protein composition influences instrumental measures of rice cooking and eating quality. *Journal of Cereal Science*, *79*, 35-42.

Biancucci, M., Mattioli, R., Forlani, G., Funck, D., Costantino, P., & Trovato, M. (2015). Role of proline and GABA in sexual reproduction of angiosperms. Frontiers in Plant Science, *6*, 1-11.

Bureau of Rice Research and Development, Rice Department. (2018). *Rice knowledge bank*. Retrieved June 7, 2018, from http://brrd.ricethailand.go.th/rvdb/. (in Thai)

Filee, R., Schoos, R., & Boemer, F. (2013). Evaluation of physiological amino acids profiling by tandem mass spectrometry. *JIMD Repeports*, *13*, 119-128.

Garattini, S. (2000). Glutamic Acid, Twenty Years Later. The Journal of Nutrition, *130* (4), 901–909.

Hildebrandt, T.M., Nesi, A.N., Araujo, W.L., & Braun H.P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant*, *8*, 1563-1579.

Hirano, T., Bekhasut, P., Sommut, W., Zungsontiporn, S., Kondo, A., Saka, H., & Michiyama, H. (2014). Differences in elongation growth between floating and deepwater rice plants grown under severe flooding in Thailand. *Field Crops Research*, *160*, 73-76.

Jiang, C., Cheng, Z., Zhang, C., Yu, T., Zhong, Q., Shen, J.Q., & Huang, X. (2014). Proteomic analysis of seed storage proteins in wild rice species of the *Oryza* genus. *Proteome Science*, *12* (51), 1-12.

Jimenez-Martin, E., Ruiz, J., Perez-Palacios, T., Silva, A., & Antequera, T. (2012). Gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of free amino acids as their dimethyl-tert-butylsilyl (TBDMS) derivatives in animal source food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 2456-2463.

Juliano, B.O. (1972). The rice caryopsis and its composition, In D.F. Houston (Ed.), *Rice: Chemistry and Technology*. (pp. 16-74). Minnesota. American Association of Cereal Chemists.

Kalman, D.S. (2014). Amino acid composition of an organic brown rice protein concentrate and isolate compared to soy and whey concentrates and isolates. *Foods*, *3*(3), 394-402.

Karladeea, D., & Suriyong, S. (2012). γ-Aminobutyric acid (GABA) content in different varieties of brown rice during germination. *ScienceAsia*, *38*, 13-17.

Kjeldahl, J. (1883). A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, *22*, 366-382.

Li, F., Yin, Y., Tan, B., Kong, X., & Wu, G. (2011). Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. *Amino Acids*, *41*, 1185-1193.

Li, Z., Yu, J., Peng, Y., & Huang, B. (2017), Metabolic pathways regulated by abscisic acid, salicylic acid and γ-aminobutyric acid in association with improved drought tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Physiologia Plantarum*, *159*, 42-58.

Mahasing, P., Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, O. (2013). Functional properties of rice protein hydrolyzed by bromelain. *Agricultural Science Journal*, *44*(2), 129-132. (in Thai)

Nguyen, H. C., Hoefgen, R., & Hesse, H. (2012). Improving the nutritive value of rice seeds: elevation of cysteine and methionine contents in rice plants by ectopic expression of a bacterial serine acetyltransferase, *Journal of Experimental Botany*, *63*(16), 5991–6001.

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

Santos, K.F.N., Silveira, R.D.D., Didonet, C.C.G.M., & Brondani, C., (2013). Storage protein profile and amino acid content in wild rice Oryza glumaepatula. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *48*(1), 66-72.

Signorelli Poppolo, S., Dans, P. D., Coitino, E. L., Borsani, O., & Monza, J. (2015). Connecting proline and γ-aminobutyric acid in stressed plants through non-enzymatic reactions. *PLoS One*, *10*(3), 1-14.

Thitisaksakul, M., Tananuwong, K., Shoemaker, C.F., Chun, A., Tanadul, O.U., Labavitch, J.M., & Beckles, D.M. (2015). Effects of timing and severity of salinity stress on rice (*Oryza sativa* L.) yield, grain composition, and starch functionality. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *63*(8), 2296-2304.

U-bonrat, T., Janprasert, K., & Pongprayoon, W. (2017). Physiological responses and clustering of four aromatic rice cultivars to NaCl salt stress. *Burapha Science Journal*, *22*(2), 233-247. (in Thai)

Wang, Y., Gu, W., Meng, Y., Xie, T., Li, L., Li, J., & Wei, S. (2017). γ-Aminobutyric acid imparts partial protection from salt stress injury to maize seedlings by improving photosynthesis and upregulating osmoprotectants and antioxidants. *Scientific Reports*, *7*, 1-13.

Wiset, L. (2012). Factors affecting the cooking qualities of rice. *Burapha Science Journal*, *17*(1), 172-180. (in Thai)

Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S. & Blanchard, C. (2002). Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science & Technology*, *37*, 849-868.