

สารประกอบลิกแนนและยีน *Pinoresinol-lariciresinol Reductases 3*
ในข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่
Lignan Constituents and *Pinoresinol-lariciresinol Reductase 3* Gene
in Riceberry Rice

กนกวรรณ ลิ้มเจริญ¹ วศินี พูลสวัสดิ์² ปริญญา มณีประเสริฐ³ และจรรีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา^{4*}

Kanocwan Limchareon¹, Wasinee Poonsawat², Pariya Maneeprasert³, and Chareerat Mongkolsiriwatana^{4*}

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้ คือ เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณสารลิกแนนในเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยเทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) และโคลนยีนที่กำหนดเอนไซม์ Pinoresinol-lariciresinol Reductase (PLR) ในวิธีการสังเคราะห์สารลิกแนนในข้าวไรซ์เบอร์รี่ จากผลการทดลองพบสารลิกแนนชนิดซีโคไอโซลาริซิเรซินอลปริมาณ 1.70 ± 0.20 1.96 ± 0.25 และ 3.14 ± 0.19 มิลลิกรัม/กรัมข้าวอบ ในระยะน้ำนม ข้าวเม่า และข้าวสาร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของยีน *PLR* Homolog จากจีโนมข้าวไรซ์เบอร์รี่ พบว่า ยีน *OsPLR3* มีขนาด 2,449 คู่เบส ประกอบด้วย 5 เอกซอน และ 4 อินทอน มีบริเวณที่กำหนดรหัสกรดอะมิโน 921 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสได้สายพอลิเปปไทด์ 306 กรดอะมิโน โดยพบโดเมนอนุรักษ์ Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding Proteins และกรดอะมิโนไลซีน (K) ทำหน้าเร่งปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันของเอนไซม์ PLR จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsPLR3* ในแต่ละระยะของการพัฒนาเมล็ด พบว่ายีนมีการแสดงออกต่ำสุดในระยะน้ำนม แล้วเพิ่มขึ้นในระยะข้าวเม่า สูงสุดในระยะข้าวสาร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการสะสมสารซีโคไอโซลาริซิเรซินอลในเมล็ด จึงคาดว่าปริมาณการสะสมซีโคไอโซลาริซิเรซินอลในเมล็ดข้าวถูกควบคุมโดยยีน *OsPLR3*

¹นิสิตปริญญาโท โครงการสหวิทยาการ สาขาพันธุวิศวกรรมและชีวสารสนเทศ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

²นักวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยวิทยาการสุขภาพ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ตำบลไทยบุรี อ.ท่าศาลา นครศรีธรรมราช 80160

³นิสิตปริญญาเอก โครงการสหวิทยาการสาขาพันธุวิศวกรรมและชีวสารสนเทศ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

⁴ผศ. ดร., วิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน นครปฐม 73140

¹Master Student, Interdisciplinary Graduate Program in Genetic Engineering, Graduate School, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900, Thailand

²Scientist, Research Institute for Health Sciences, Walailak University, Thaiburi, Tha-Sala, Nakhon Si Thammarat, 80160, Thailand

³PhD Student, Interdisciplinary Graduate Program in Genetic Engineering, Graduate School, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900, Thailand

⁴Asst. Prof. Dr., Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand

*Corresponding author: chareerat.p@ku.th, faasrcp@ku.ac.th

(Received: June 24, 2023; Revised: August 20, 2023; Accepted: August 29, 2023)

คำสำคัญ: ลิกแนน, ข้าวไรซ์เบอร์รี่, เอนไซม์ Pinoresinol-lariciresinol Reductase (PLR), ยีน *OsPLR3*

Abstract

The objective of this research was to identify type and content of lignans in seed of Riceberry rice, stage of milk, dough and maturity, using HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and to clone *PLR* gene encoding Pinoresinol - lariciresinol reductase, a key enzyme in lignan biosynthesis pathway. The secoisolariciresinol (SECO) lignan was found, 1.70 ± 0.20 , 1.96 ± 0.25 and 3.14 ± 0.19 mg/g, in milk, dough and maturity, respectively. The molecular structure of *PLR* homolog gene was 2,449 bps in length that comprised of 5 exons and 4 introns with 921 open reading frame (ORF) encoding 306 amino acids polypeptide. The Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins, a conserved domain for dehydrogenation was identified with a key amino acid, lysine, for active site. Expression analysis of *OsPLR3* in the stages of seed development was performed. The lowest expression was found at milk and gradually inclined to highest expression at maturity stage. This showed correlation to SECO accumulation content during seed development. These suggest that SECO accumulation was probably controlled by *OsPLR3* gene.

Keywords: Lignan, Riceberry, Pinoresinol - lariciresinol Reductase (PLR) Enzyme, *OsPLR3* Gene

บทนำ (Introduction)

ลิกแนน (Lignan) เป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [1] ต้านเบาหวาน และไฟโตเอสโตรเจนที่นิยมนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในสตรีวัยทอง [2] พบมากในธัญพืชโดยเฉพาะในแฟลกซ์ (Flax) ซึ่งมีรายงานว่าสารสกัดจากเมล็ดแฟลกซ์และสารสกัดลิกแนนจากเมล็ดแฟลกซ์ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวาน และได้มีการขยายผลการศึกษาในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 Diabetes) พบว่าสารสกัดลิกแนนในรูปของอาหารเสริมสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ควบคุมปริมาณไขมัน และเพิ่มความไวต่อการทำงานของฮอร์โมนอินซูลิน [3] นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองกับหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 1 (Type 1 Diabetes) พบว่าสารสกัดลิกแนนจากเมล็ดแฟลกซ์มีประสิทธิภาพในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้เช่นเดียวกัน [4] ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของสารออกฤทธิ์ชีวภาพลิกแนนในการควบคุมน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน โดยสารลิกแนนช่วยป้องกันการพัฒนาโรคเบาหวานได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ [5] ลดปริมาณคลอเลสเทอรอลรวมและรักษาระดับค่าน้ำตาลเฉลี่ยสะสม (Glycated Hemoglobin A1C, HbA1c) ของผู้ป่วยเบาหวาน [6] โดยไปลดการแสดงออกของยีนที่กำหนดเอนไซม์ Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 [2] สามารถรักษาสมาดุลของระดับน้ำตาลในเลือดได้ จึงทำให้สารลิกแนนได้รับความสนใจ และถูกนำมาพัฒนาเป็นอาหารเสริม รวมทั้งส่งเสริมการบริโภคอาหารที่เป็นแหล่งของลิกแนนเพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวาน [7] นอกจากนี้ สารลิกแนนได้ถูกนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนสำหรับสตรีวัยหมดประจำเดือน เพื่อลดกลุ่มอาการวัยทอง เช่น ร้อนวูบวาบ เหงื่อออกเวลากลางคืน หงุดหงิดง่าย รวมทั้งป้องกันมะเร็งเนื่องจากฮอร์โมน ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งรังไข่ [8] Simbalista et al., (2010) [9] พบว่าหญิงวัยหมดประจำเดือนที่ได้รับสารลิกแนน 46 มิลลิกรัมต่อวัน ต่อเนื่องเป็นเวลา 12 สัปดาห์สามารถลดกลุ่มอาการวัยทองได้

สารลิกแนนในพืชมีด้วยกัน 7 ชนิด คือ พิโนเรซินอล (Pinoresinol) ลาริซิเรซินอล (Lariciresinol) ซีโคไอโซลาริซิเรซินอล (Secoisolariciresinol) มาไทเรซินอล (Matairesinol) ไฮดรอกซีมาไทเรซินอล (Hydroxymatairesinol) ซิงการิเรซินอล (Syringaresinol) และเซซามิน (Sesamin) ซึ่งลิกแนนที่พบได้ในพืชอาหารทั่วไปอาจอยู่ในรูปอนุพันธ์ที่เชื่อมต่อกับน้ำตาล หรือไม่มีน้ำตาลก็ได้ [10] และพบได้ทั่วไปตามส่วนต่าง ๆ ของพืช ไม่ว่าจะเป็นส่วนลำต้น ราก ใบ ดอก ผล และ เมล็ด

ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ลิแกนที่ตรวจพบในอาหารที่มาจากพืชมักจะเป็นชนิด ลาริซิเรซินอล มาไทเรซินอล พิโนเรซินอล และ ซีโคไอโซลาริซิเรซินอล ซึ่งเป็นลิแกนที่พบมากในเมล็ดแฟลกซ์ และได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง คือ ซีโคไอโซลาริซิเรซินอลที่จับอยู่กับน้ำตาล (Secoisolariciresinol Diglucoside, SDG) โดยเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สารกลุ่มนี้ คือ Pinoresinol-lariciresinol Reductase (PLR) โดยนำ อี-โคนิเฟอร์ิล แอลกอฮอล์ (E-coniferyl Alcohol) สองโมเลกุลรวมกัน ได้เป็นพิโนเรซินอล จากนั้นถูกเปลี่ยนเป็นลาริซิเรซินอล และ ซีโคไอโซลาริซิเรซินอล ตามลำดับ [11]

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีความสนใจในการค้นหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้านเบาหวาน โดยเฉพาะข้าวสี (Color Rice) เนื่องจากเป็นข้าวที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีนที่มีกรดอะมิโน ที่จำเป็น ไขมันดี วิตามินบี 1 และ บี 2 โอรีซานอล และโนอาซิน รวมทั้งยังมีเกลือแร่ (แคลเซียม โพแทสเซียม เหล็ก และ สังกะสี) และ กรดไฟติก [12] จึงจัดให้ข้าวกล้องเป็นสุดยอดอาหารธัญพืชที่สามารถพัฒนาเป็นธัญโอสโดยเฉพาะข้าวไทยพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดสำหรับสตรีวัยทอง ซึ่งเป็นวัยที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวาน รวมทั้งผู้ป่วยเบาหวานทั่วไป

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นข้าวสีโภชนาการสูง (High Nutritious Rice) มาจากการคัดเลือกและพัฒนาพันธุ์ โดยการผสมระหว่างพันธุ์หอมนิลกับข้าวดอกมะลิ 105 จนได้พันธุ์ข้าวที่มีคุณค่าทางอาหารและฤทธิ์ทางโภชนาการที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย อาทิ สารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยชะลอการเสื่อมของเซลล์ ลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งได้แก่ แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) แกมมาโอไรซานอล (Gamma Oryzanol) วิตามินอี ในกลุ่มโทโคฟีรอล ฟลาโวนอยด์ ฟิโนลิก รวมทั้ง ธาตุเหล็ก ธาตุสังกะสี และวิตามิน B1 B2 B3 โอเมก้า 3 6 9 และสาร ASGs (Acyalted Steryl Glucosides) ที่ช่วยการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินและควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด [13] ข้าวไรซ์เบอร์รี่ จึงเป็นธัญโอสและแหล่งฮอร์โมนทดแทนทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับสตรีวัยทอง แต่อย่างไรก็ดี ยังไม่มีการศึกษาถึงชนิดและปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนในเมล็ดข้าวพันธุ์นี้ จึงเป็นที่มาของงานวิจัยที่ต้องการศึกษาชนิดและปริมาณสารลิแกนที่มีคุณสมบัติเป็นทั้งไฟโตเอสโตรเจนและฤทธิ์ด้านเบาหวานในเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ระยะต่าง ๆ รวมทั้งโคลนและวิเคราะห์แสดงออกของยีนที่กำหนดรหัสเอนไซม์ Pinoresinol-lariciresinol Reductase หรือ ยีน *PLR* ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดเอนไซม์หลักในวิถีการสังเคราะห์สารลิแกนจากจีโนมข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้นอกจากใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์บ่งชี้สรรพคุณของข้าวไรซ์เบอร์รี่แล้ว ยังสามารถนำไปขยายผลการศึกษาในข้าวไทยพันธุ์ต่างๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าในเชิงโภชนาการให้กับข้าวไทยต่อไปได้

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ (Materials and Methodology)

การเตรียมตัวอย่างพืช

ปลูกข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ ในกระถางดินเผาเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร ในโรงเรือนระบบปิด จนกระทั่งข้าวออกรวงและติดเมล็ด จึงเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวระยะน้ำนม (Milk) ข้าวเฝ้า (Dough) และ ข้าวสาร (Maturity) ในวันที่ 8, 14 และ 30 วัน หลังจากที่ได้ข้าวติดเมล็ดแล้วตามลำดับ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 แถว แถวละ 5 กระถาง เก็บตัวอย่างที่ได้จากแถวเดียวกันนำมารวมกัน โดยคิดเป็น 1 ซ้ำ (1 Biological Replication) ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วแบ่งตัวอย่างแต่ละซ้ำออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่ 1 สำหรับวิเคราะห์หาชนิด และปริมาณสารลิแกนด้วย เทคนิค HPLC และส่วนที่ 2 สำหรับสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PLR* Homolog

การเตรียมสารสกัดข้าว

สกัดสารลิแกนจากข้าวโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรดโดยใช้ความร้อน ดัดแปลงจากวิธีของ Hutabarat et al., (2000) [14] โดยชั่งเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ระยะต่างๆ ที่บดละเอียด 1 กรัม สกัดด้วย 10 มิลลิลิตร ของ 2 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก และ 40 มิลลิลิตร ของ 96 เปอร์เซ็นต์เอทานอลที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทิ้งให้สารละลายเย็นลงจึงนำมาปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย 96 เปอร์เซ็นต์เอทานอลทำการสกัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

การวิเคราะห์หาชนิดสารลิแกนโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารลิแกนโดยวิธี HPLC ดัดแปลงจากวิธีของ Kuhnle et al., (2007) [15] โดยการศึกษาครั้งนี้ ใช้สารมาตรฐานลิแกน ได้แก่ ซีโคไอโซลาริซินีโอล มาไทเรซินีโอล และคูเมสทอล เตรียมสารละลายมาตรฐานละลายในเมทานอลให้ความเข้มข้นต่าง ๆ กรองสารละลายมาตรฐานผ่าน Syringe Filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำมาวิเคราะห์โดยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18 Reverse-phase (4.6 mm x 250 mm, ACE, UK) เป็นเฟสคงที่ 0.025 เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติกในน้ำ : อะซิโตนไตรลในอัตราส่วน 33 ต่อ 67 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ฉีดตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร อัตราการไหล 1 มิลลิเมตรต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ด้วยตัวตรวจวัดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ (Photodiode Array Detector) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารลิแกนเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์

การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบอ่อนของข้าวไรซ์เบอร์รี่มาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB โดยดัดแปลงมาจาก Saghai-Marooof et al., (1984) [16] โดยมีวิธีการพอสั่งเบดังนี้ บดตัวอย่างใบข้าวในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด แล้วเติมลงในหลอดที่มีบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ (Isolation Buffer; 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 % β -mercaptoethanol) ปริมาตร 5 มิลลิเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พลั่วให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมสารละลาย Chloroform : Isoamyl Alcohol (24: 1) ปริมาตร 5 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลที่เย็นจัดปริมาตร 5 มิลลิเมตร (1 เท่า ของสารละลายที่ดูดได้) กลับหลอดไปมาจนเห็นตะกอนดีเอ็นเอเป็นเส้นใยสีขาว แล้วเกี่ยวตะกอนลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิเมตร ที่มีเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งไป พลั่วให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE Buffer; 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์และวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร [17]

การโคลนยีน PLR ด้วยเทคนิค PCR

สืบค้นข้อมูลยีน PLR ของพืชในฐานข้อมูลสากล Genbank เลือกยีน *LuPLR1* ของแฟลกซ์ (*Linum usitatissimum*) แล้วดาวน์โหลดลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ *LuPLR1* (หมายเลข PODKC8) มาวิเคราะห์หา *PLR* Homolog ในฐานข้อมูลของข้าว Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) และจีโนมข้าวใน Genbank โดยใช้โปรแกรม tblastn นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่คาดว่าจะเป็ยีน *PLR* Homolog จากจีโนมข้าว มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *PLR* Homolog ที่สมบูรณ์ (Full Length) ด้วยเทคนิค PCR โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา คือ สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 50 ng/ μ l ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ 10x Buffer ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร, 20 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร, 2 mM dNTP mix ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร, 5 μ M *OsPLR_F* Primer และ 5 μ M *OsPLR_R* Primer ปริมาตรอย่างละ 2 ไมโครลิตร, 5U/ μ l *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, USA) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นความบริสุทธิ์สูง (Ultrapure Water) ให้ได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR โดยตั้งอุณหภูมิ และเวลา 3 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส 40 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที ทำซ้ำ 30 รอบ และ ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีอเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส

ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM[®]T Easy Vector (Promega, USA) ถ่ายเข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธีทรานส์ฟอร์เมชัน (Transformation) คัดเลือกโคลนีสีขาว นำมาสกัดแยกพลาสมิดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Presto[™] Mini Plasmid kit (Geneaid, Korea) แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen (Macrogen, Korea) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จัดเก็บเข้าสู่ฐานข้อมูลสากล

การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BlastN [18] เพื่อยืนยันผล แล้วนำไปวิเคราะห์โครงสร้าง หาดำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างเอกซอนกับอินทอนด้วยโปรแกรม Splign [19] นำเฉพาะบริเวณเอกซอนมาวิเคราะห์ หาบริเวณที่กำหนดกรดอะมิโน (ORF: Open Reading Frame) ด้วยโปรแกรม Expasy [20] วิเคราะห์หาโดเมนอนุรักษ์ และตำแหน่งปฏิกิริยา (Active Site) ด้วยโปรแกรม Conserved Domain Search Service [21]

การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

นำเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ระยะน้ำนม ข้าวเม่า และข้าวสาร มาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Trizol (Invitrogen, USA) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร [17] จากนั้นนำสารละลายอาร์เอ็นเอของตัวอย่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 ระยะ มาสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ Reverse Transcription ที่ใช้ Oligo dT เป็นไพรเมอร์ ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript III First-strand Synthesis System (Invitrogen, USA)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative RT-PCR

นำตัวอย่าง cDNA สายเดี่ยวมาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป iTaq[™] Universal SYBR[®] Green Supermix (Bio-RAD, USA) โดยส่วนผสมของปฏิกิริยา ประกอบด้วย cDNA (เจือจาง 10 เท่า) 1 ไมโครลิตร, 2X iTaq[™] Universal SYBR[®] Green Reaction Mix 7.5 ไมโครลิตร, 5 μ M Forward Primer และ Reverse Primer อย่างละ 0.3 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์สูงให้ปริมาตรครบ 15 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่อง CFX 96[™] (Bio-rad, USA) ตั้งอุณหภูมิ และเวลา 3 ขั้นตอน คือ ขั้นที่ 1 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ขั้นที่ 2 95 องศาเซลเซียส 5 วินาที 60 องศาเซลเซียส (Annealing/Extension) 30 วินาที ทำซ้ำ 35 รอบ ขั้นที่ 3 วิเคราะห์ Melting Temperature ที่ 65 ถึง 95 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิทีละ 0.5 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนแบบเปรียบเทียบ (Relative) ด้วยวิธีเดลต้าซีที (Δ CT) โดยใช้ระดับการแสดงออกของยีน *Actin1* ในการปรับค่า (Normalization) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ [22] โดยรายละเอียดไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative RT-PCR

ชื่อยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5'→3')	Tm (°C)	Ta (°C)	ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (คู่เบส)
<i>OsPLR3</i>	Forward: AGATGCACATTGCCATTGCCCTTGA	59.0	60	257
	Reverse: CCCTAGCAAGTTGAGGTAGGC	60.3		
<i>Actin 1</i>	Forward: TCCATCTTGGCATCTCTCAG	59.3	60	337
	Reverse: GTA CCC GCA TCA GGC ATC TG	61.1		

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis)

การวิเคราะห์ข้อมูลแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS (Version 17.0) โดยใช้ One-way ANOVA ค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการวิจัย (Results)

การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารซีโคไอโซลาริซิเรซินอลด้วยเทคนิค HPLC

จากการส่งตัวอย่างเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ ระยะนํ้านม ข้าวเม่า และ ข้าวสาร วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารลิแกนด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้สารมาตรฐาน ซีโคไอโซลาริซิเรซินอล พบสารลิแกนชนิดนี้ในเมล็ดข้าวทั้งสามระยะ โดยพบการสะสมของซีโคไอโซลาริซิเรซินอลในเมล็ดข้าวสารในปริมาณสูงสุด คือ 3.14 มิลลิกรัม/กรัมข้าวอบ รองลงมา คือ ระยะข้าวเม่า และ ระยะนํ้านม ในปริมาณ 1.96 และ 1.70 มิลลิกรัม/กรัมข้าวอบตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ มีการสะสมสารลิแกนชนิดซีโคไอโซลาริซิเรซินอล

ตารางที่ 2 ปริมาณสารซีโคไอโซลาริซิเรซินอลในสารสกัดจากข้าวไรซ์เบอร์รี่

สารสกัดจากตัวอย่างข้าว	ซีโคไอโซลาริซิเรซินอล (มิลลิกรัม/กรัมข้าวอบ)
นํ้านม	1.70 ± 0.20^a
ข้าวเม่า	1.96 ± 0.25^a
ข้าวสาร	3.14 ± 0.19^b

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b ที่แตกต่างกันแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

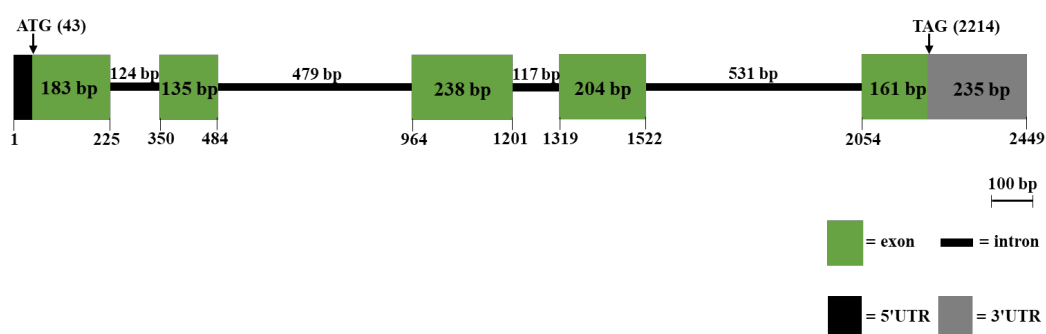
การโคลนยีน PLR Homolog

จากการค้นหายีนที่กำหนดเอนไซม์ PLR Homolog จากจีโนมข้าวในฐานข้อมูล โดยใช้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีน LuPLR1 ของแฟลกซ์หมายเลข PODK8 โดยใช้วิธี Blast Genome โดยเลือกฐานข้อมูลจีโนมข้าวอินดิกา (Indica) พบว่า ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์หมายเลข GenBank CP012610.1:29347550-29350002 *Oryza sativa* Indica Group Cultivar RP Bio-226 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่กำหนดรหัสเอนไซม์ PLR จากนั้นจึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มาออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน PLR Homolog ที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค PCR ไพรเมอร์ที่ได้ คือ OsPLR_F (5'-CTATCCGAACGCTCTAGATCTTA TC-3') และ OsPLR_R (5'-AACCAAAAAAGATCATATTATTGAATGAGA-3') พบว่าขั้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 2,449 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูลสากล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN โดยเลือกเงื่อนไข Highly Similar Sequences (Megablast) พบว่าขั้นดีเอ็นเอที่โคลนได้นี้มีความเหมือนกับยีนที่กำหนดรหัสเอนไซม์ Pinoresinol-lariciresinol Reductases 3 ในข้าวจาโปนิกา (LOC4330458) 99 เปอร์เซ็นต์ ข้าวบาเซนทรา (LOC102704125) 94 เปอร์เซ็นต์ หญ้า *Aegilops tauschii* subsp. *tauschii* (LOC109760684) 86 เปอร์เซ็นต์ และ ข้าวฟ่าง (LOC8073160) 86 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงพืชชนิดอื่น ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายีนที่โคลนได้เป็นยีน PLR Homolog ที่กำหนดรหัสเอนไซม์ PLR ในวิถีการสังเคราะห์สารลิแกนในข้าว ตั้งชื่อยีนที่โคลนได้ว่า OsPLR3

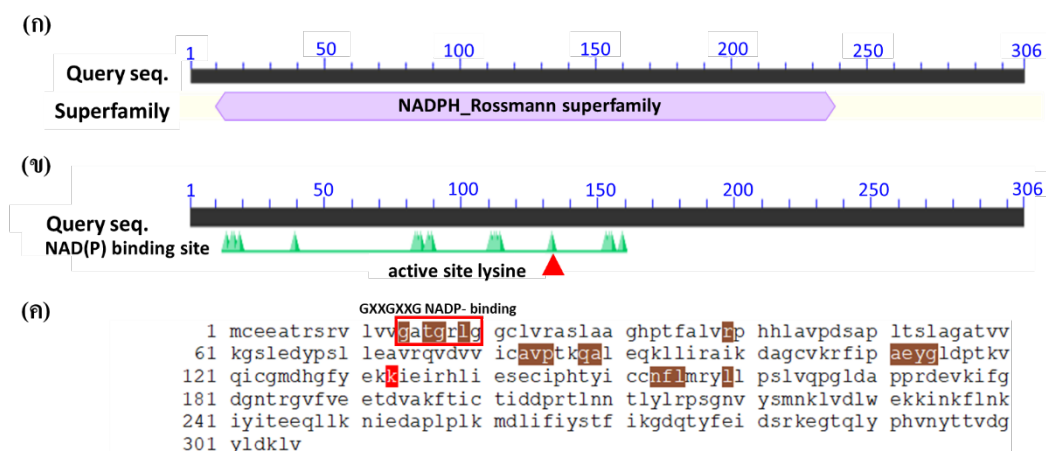
ลักษณะเชิงโมเลกุลของยีน OsPLR3

เมื่อนำยีน OsPLR3 ที่โคลนได้จากจีโนมข้าวไรซ์เบอร์รี่ วิเคราะห์โครงสร้างเชิงโมเลกุล พบว่า มีขนาด 2,449 คู่เบส ประกอบด้วยเอกซอน 5 เอกซอน โดยแต่ละเอกซอนมีขนาด 225, 135, 238, 204 และ 396 คู่เบส ตามลำดับ และ 4 อินทอน ที่มีขนาด 124, 479, 117 และ 531 คู่เบสตามลำดับ (ภาพที่ 1) ถอดรหัสได้เป็นสาย mRNA ที่มีขนาด 1,198 นิวคลีโอไทด์ ที่ประกอบด้วยบริเวณ 5'UTR และ 3'UTR ขนาด 42 และ 235 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ เป็นบริเวณที่กำหนดรหัสกรด

อะมิโน (Open Reading Frame ; ORF) 921 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสได้สายโพลีเปปไทด์ที่ประกอบด้วย 306 กรดอะมิโน (ภาพที่ 2 ค) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาวิเคราะห์โดเมนภายในสายโพลีเปปไทด์ด้วยโปรแกรม Conserved Domain พบว่า ตำแหน่งกรดอะมิโน 10-238 เป็น Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding Proteins ซึ่งเป็นโดเมนสำคัญในปฏิกิริยา ดีไฮโดรจีเนชันของเอนไซม์ PLR (ภาพที่ 2 ก) โดยกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 14, 16, 17, 19, 39, 83, 84, 85, 88, 89, 111, 112, 113, 114, 133, 153, 154, 155 และ 160 เป็นตำแหน่ง NAD(P) Binding Site (ภาพที่ 2 ข) โดยตำแหน่งที่ 133 (K) เป็นตำแหน่งเร่งปฏิกิริยา (Active Site) และพบโมทิฟอนุรักษ์ GXXGXXG NADP-binding ทางด้านปลายเอ็น (N-terminal) (ภาพที่ 2 ค) ที่บ่งชี้การทำงานที่จำเพาะของเอนไซม์ PLR [23] จึงเป็นการยืนยันว่ายีน *OsPLR3* กำหนดเอนไซม์ PLR Homolog ในวิธีการสังเคราะห์สารลิแกนเช่นเดียวกับเอนไซม์ PLR ในแฟล็กซ์ และพืชชนิดอื่น [24]



ภาพที่ 1 โครงสร้างเชิงโมเลกุลยีน *OsPLR3* ของข้าวไรซ์เบอร์รี่

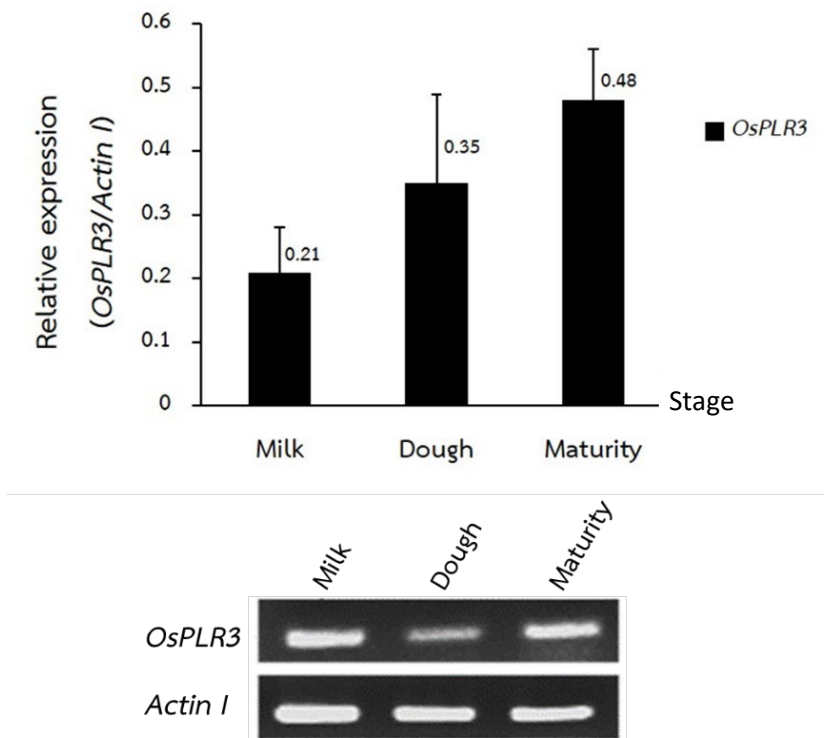


ภาพที่ 2 โดเมนอนุรักษ์ Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding Proteins ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 10-238 (ก) และตำแหน่ง NAD(P) ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 14, 16, 17, 19, 39, 83, 84, 85, 88, 89, 111, 112, 113, 114, 133, 153, 154, 155 และ 160 (ข) โดยตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 133 เป็น Lysine (K) Active Site และตำแหน่งที่ 14 ถึง 20 พบโมทิฟอนุรักษ์ GXXGXXG NADP-binding ทางด้านปลายเอ็น (ค) ของสายโพลีเปปไทด์ *OsPLR3* ในข้าวไรซ์เบอร์รี่

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsPLR3* ในข้าวไรซ์เบอร์รี่โดยเทคนิค Quantitative RT-PCR

จากการตรวจสอบแสดงออกของยีน *OsPLR3* ในเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ระยะน้ำนม ระยะข้าวเม่า และ ระยะข้าวสารใน ระดับการถอดรหัส (Transcription) ด้วยเทคนิค Quantitative RT-PCR แบบเปรียบเทียบ (Relative Expression) โดยใช้ การแสดงออกของยีน *Actin 1* เป็นยีนอ้างอิง พบการแสดงออกในเมล็ดข้าวทุกระยะ โดยมีการแสดงออกต่ำสุดในระยะน้ำนม

(0.21) แล้วเพิ่มขึ้นในระยะข้าวเม่า (0.35) และมีการแสดงออกสูงสุดในระยะข้าวสาร (0.48) (ภาพที่ 3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของยีนแปรผันตรงกับการพัฒนาของเมล็ดข้าว



ภาพที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีน *OsPLR3* ของข้าวไรซ์เบอร์รี่ 3 ระยะ ได้แก่ ระยะน้ำนม (Milk) ระยะข้าวเม่า (Dough) และระยะข้าวสาร (Maturity) ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Quantitative RT-PCR และยืนยันผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

การอภิปรายผล (Discussion)

ข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นข้าวสีที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยคุณประโยชน์ที่เด่นชัดที่สุดจะพบได้ในส่วนรำข้าวซึ่งเป็นเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้ม มีปริมาณการสะสมแอนโทไซยานินในระดับความเข้มข้น 15.7 มิลลิกรัม/100 กรัม รวมทั้งสารออกฤทธิ์ชีวภาพอีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและป้องกันโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-communicable Diseases หรือ NCD) เช่น แกมมาโอไรซานอล ที่ช่วยลดระดับคอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในหลอดเลือด ทำให้เลือดหมุนเวียนไปเลี้ยงอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกายได้อย่างเป็นปกติ ลดอัตราเสี่ยงของโรคหัวใจ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และสมองเสื่อม หรือ วิตามินอี ที่ช่วยชะลอความแก่ บำรุงผิวพรรณ ลดอัตราเสี่ยงของโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดสมองและหัวใจ ทำให้ปอดทำงานดีขึ้น [25] และเป็นข้าวที่มีดัชนีน้ำตาล (GI เท่ากับ 62) ต่ำกว่าข้าวทั่วไป (GI เท่ากับ 73) [13] จึงเป็นเป็นธัญโอสที่ที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นโภชนาบำบัดสำหรับสตรีวัยทองซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงต่อโรคเบาหวานและโรคที่เกิดจากความเสื่อมถอยของวัย ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้ได้ค้นหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพหลักที่มีสรรพคุณเป็นได้ทั้งฮอร์โมนทดแทน (ไฟโตเอสโตรเจน) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเบาหวาน ในเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ทั้ง 3 ระยะ ได้แก่ ระยะน้ำนม ข้าวเม่า และข้าวสาร ซึ่งเป็นระยะที่นิยมบริโภค จึงเหมาะที่จะนำมาพัฒนาเป็นอาหารสุขภาพ (Functional Food) จากผลการทดลอง พบสารลิแกแนนชนิดซีโคโอโซลาริซิเรซินอลในเมล็ดข้าวทั้งสามระยะ โดยพบปริมาณต่ำสุดในระยะน้ำนม แล้วมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระยะข้าวเม่าและสูงสุดในระยะข้าวสาร (ภาพที่ 1) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการสังเคราะห์และสะสมสารลิแกแนนมีความสัมพันธ์กับระยะการพัฒนาของเมล็ดข้าว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Hano et al. (2006) [11] ที่พบว่าในเมล็ดอ่อนของแฟลกซ์มีลิแกแนนชนิดซีโคโอโซลาริซิเรซินอลต่ำสุด คือ ปริมาณ 5.0 ± 0.3 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แล้วเพิ่มขึ้นตามระยะการพัฒนาของเมล็ดจนสูงสุด ในเมล็ด

ระยะเก็บเกี่ยว คือ 14 ± 1.3 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แสดงให้เห็นว่าเมล็ดข้าวระยะข้าวสารเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งลิแกเนนทางเลือก

จากการโคลนวิเคราะห์คุณลักษณะเชิงโมเลกุลของยีน *PLR Homolog* ที่กำหนดรหัสเอนไซม์ PLR ในวิธีการสังเคราะห์ซีโคโอโซลาริซิเรซินอลในข้าวไร่เบอร์รี่ พบว่า ยีนที่โคลนได้กำหนดเอนไซม์ *Pinoresinol-lariciresinol Reductase 3* มีโครงสร้างเชิงโมเลกุลที่ประกอบด้วย 5 เอกซอน 4 อินทรอน กำหนดสายโพลีเปปไทด์ขนาด 306 กรดอะมิโน โดยมีส่วนโดเมนอนุรักษ NAD(P) Binding Site (GXXGXXG NADP-binding) และตำแหน่งเร่งปฏิกิริยา (Lysine (K) Active Site) เช่นเดียวกับเอนไซม์ PLR ที่พบในพืชชนิดอื่น เช่น *LuPLR1* และ *LuPLR2* ในแฟลกซ์ [26-27] *TcPLR1* และ *TcPLR2* ใน *Taiwania cryptomerioides* [28] และ *TpPLR1*, *TpPLR2*, *TpPLR3* และ *TpPLR4* ใน *Thuja Plicata* [29] แสดงให้เห็นว่ายีนที่โคลนได้กำหนดเอนไซม์ PLR Homolog ในวิธีการสังเคราะห์ลิแกเนนเช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น แต่อย่างไรก็ดี เอนไซม์ PLR ที่พบในพืชมีหลายไอโซฟอร์ม โดยแต่ละไอโซฟอร์มมีความจำเพาะต่ออีแนนทิโอเมอร์ (Enantiomer) ของสารตั้งต้น และมีการแสดงออกที่จำเพาะต่อน้ำเลี้ยงต่างกัน เช่น ในแฟลกซ์ พบว่า *LuPLR1* แสดงออกในเนื้อเยื่อเมล็ด ส่วน *LuPLR2* แสดงออกในเนื้อเยื่อลำต้นและใบ [11, 27] เป็นต้น เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsPLR3* ในระดับถอดรหัส (Transcription) พบการแสดงออกในเมล็ดข้าวทั้งสามระยะ โดยมีการแสดงออกต่ำสุดในระยะน้ำนมแล้วมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระยะข้าวเม่าจนสูงสุดในระยะข้าวสาร และแปรผันตรงกับปริมาณการสะสมสารซีโคโอโซลาริซิเรซินอล แสดงให้เห็นว่ายีน *OsPLR3* มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการสังเคราะห์สารลิแกเนนชนิดซีโคโอโซลาริซิเรซินอลในเมล็ด และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามระยะการพัฒนาของเมล็ดเช่นเดียวกับรูปแบบการแสดงออกของยีน *LuPLR1* ในเมล็ดแฟลกซ์ [11] จึงอนุมานได้ว่าเอนไซม์ *OsPLR3* เป็นไอโซฟอร์มที่ทำงานเทียบเคียงกับ *LuPLR1* แต่อย่างไรก็ตาม ควรขยายผลการศึกษาโดยตรวจสอบหน้าที่การทำงานของเอนไซม์ *OsPLR3* ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารลิแกเนน ตลอดจนศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในข้าวเพื่อนำไปสู่การพัฒนาพันธุ์ข้าวเป็นแหล่งลิแกเนนทางเลือก

การค้นพบสารลิแกเนนในข้าวไร่เบอร์รี่ เป็นการเพิ่มข้อมูลในเชิงโภชนาการให้กับข้าวไร่เบอร์รี่สามารถนำข้าวไร่เบอร์รี่ไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารสุขภาพสำหรับสตรีวัยทอง ป้องกันโรคเบาหวาน รวมทั้งโรคที่เกิดจากความเสื่อมถอยของวัย ซึ่งปริมาณสารลิแกเนนที่พบในข้าวไร่เบอร์รี่ระยะข้าวสาร (3.14 ± 0.19 มิลลิกรัม/กรัม) มีปริมาณเพียงพอที่จะใช้เป็นแหล่งลิแกเนนป้องกันโรค โดยบริโภคข้าวประมาณ 114.65 กรัมต่อวัน ทำให้ได้รับสารลิแกเนนประมาณ 360 มิลลิกรัมต่อวัน มีปริมาณเพียงพอสามารถใช้ป้องกันกลุ่มอาการวัยทอง [9] และรักษาระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานได้ [3] ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปขยายผลการศึกษาในข้าวพันธุ์อื่น หรือ พืชชนิดอื่นต่อไปได้

สรุปผลการวิจัย (Conclusion)

ข้าวไร่เบอร์รี่มีสารออกฤทธิ์ชีวภาพลิแกเนนชนิดซีโคโอโซลาริซิเรซินอล โดยมีการสะสมสูงสุดในระยะข้าวสาร และยีน *OsPLR 3 Homolog* ที่กำหนดเอนไซม์ *Pinoresinol-lariciresinol Reductase 3* ในวิธีการสังเคราะห์ซีโคโอโซลาริซิเรซินอล มีคุณลักษณะเชิงโมเลกุล คือ มีขนาด 2,449 คู่เบส ประกอบด้วย 5 เอกซอนและ 4 อินทรอน ถอดรหัสได้สาย mRNA 1,198 นิวคลีโอไทด์ เป็นบริเวณที่กำหนดรหัสกรดอะมิโน (ORF) 921 นิวคลีโอไทด์ ได้สายโพลีเปปไทด์ที่ประกอบ 306 กรดอะมิโน มีโดเมน และโมติฟอนุรักษที่บ่งชี้การทำงานของเอนไซม์ *Pinoresinol-lariciresinol Reductase* ยีนนี้มีการแสดงออกขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาของเมล็ด โดยมีการแสดงออกต่ำสุดในระยะน้ำนมและสูงสุดในระยะข้าวสารส่งผลให้สารลิแกเนนชนิดซีโคโอโซลาริซิเรซินอลมีปริมาณมากที่สุดในระยะข้าวสาร เป็นงานวิจัยฉบับแรกที่ศึกษาชนิด และปริมาณสารลิแกเนนในข้าวไทย ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์บ่งชี้โภชนาการของข้าวไร่เบอร์รี่ และควรขยายผลศึกษาชนิดและปริมาณสารลิแกเนนในข้าวไทยพันธุ์อื่นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์ โครงการจัดตั้งภาควิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้คำปรึกษาและให้ความอนุเคราะห์การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารลิแกนในข้าว ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Kitts, D. D., Yuan, Y. V., Wijewickreme, A. N., & Thompson, L. U. (1999). Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 202(1-2), 91-100. <https://doi.org/10.1023/a:1007022329660>
- [2] Prasad, K. (2002). Suppression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by secoisolariciresinol diglucoside (SDG), a new antidiabetic agent. *International Journal of Angiology*, 11, 107-109. <https://doi.org/10.1007/BF01616377>
- [3] Pan, A., Sun, J., Chen, Y., Ye, X., Li, H., Yu, Z., Wang, Y., Gu, W., Zhang, X., Chen, X., Demark-Wahnefried, W., Liu, Y., & Lin, X. (2007). Effects of a flaxseed-derived lignan supplement in type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, cross-over trial. *PLOS ONE*, 2(11), e1148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001148>
- [4] Prasad, K., & Dhar, A. (2016). Flaxseed and Diabetes. *Current Pharmaceutical Design*, 22(2), 141-144. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666151112151230>
- [5] Prasad, K. (2000). Oxidative stress as a mechanism of diabetes in diabetic BB prone rats: Effect of secoisolariciresinol diglucoside (SDG). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 209, 89-96. <https://doi.org/10.1023/a:1007079802459>
- [6] Prasad, K., Mantha, S., Muir, A., & Westcott, N. (2000). Protective effect of secoisolariciresinol diglucoside against streptozotocin-induced diabetes and its mechanism. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 206, 141-150. <https://doi.org/10.1023/a:1007018030524>
- [7] Sun, Q., Wedick, N. M., Pan, A., Townsend, M. K., Cassidy, A., Franke, A. A., Rimm, E. B., Hu, F. B., & van Dam, R. M. (2014). Gut microbiota metabolites of dietary lignans and risk of type 2 diabetes: A prospective investigation in two cohorts of U.S. women. *Diabetes Care*, 37(5), 1287-1295. <https://doi.org/10.2337/dc13-2513>
- [8] Cornwell, T., Cohick, W., & Raskin, I. (2004). Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, 65(8), 995-1016. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.03.005>
- [9] Simbalista, R. L., Sauerbronn, A. V., Aldrichi, J. M., & Arêas, J. A. G. (2010). Consumption of a flaxseed-rich food is not more effective than a placebo in alleviating the climacteric symptoms of postmenopausal women 1, 2. *The Journal of Nutrition*, 140(2), 293-297. <https://doi.org/10.3945/jn.109.113886>
- [10] Saleem, M., Kim, H. J., Ali, M. S., & Lee, Y. S. (2005). An Update on Bioactive Plant Lignans. *Natural Product Reports*, 22, 696-716. <https://doi.org/10.1039/b514045p>

- [11] Hano, C., Martin, I., Fliniaux, O., Legrand, B., Gutierrez, L., Arroo, R. R. J., Mesnard, F., Lamblin, F., & Lainé, E. (2006). Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds. *Planta*, 224, 1291-1301. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0308-y>
- [12] Min, B., Gu, L., McClung, A. M., Bergman, C. J., & Chen, M.-H. (2012). Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. *Food Chemistry*, 133(3), 715-722. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.079>
- [13] Leardkamolkarn, V., Thongthep, W., Suttiarporn, P., Kongkachuichai, R., Wongpornchai, S., & Wanavijitr, A. (2011). Chemopreventive properties of the bran extracted from a newly-developed Thai rice: The Riceberry. *Food Chemistry*, 125(3), 978-985. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.093>
- [14] Hutabarat, L. S., Greenfield, H., & Mulholland, M. (2000). Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 886(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00444-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00444-1)
- [15] Kuhnle, G. G. C., Dell'Aquila, C., Low, Y. L., Kussmaul, M., & Bingham, S. A. (2007). Extraction and quantification of phytoestrogens in foods using automated solid-phase extraction and LC/MS/MS. *Analytical Chemistry*, 79(23), 9234-9239. <https://doi.org/10.1021/ac701732r>
- [16] Saghai-Maroo, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., & Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(24), 8014-8018. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014>
- [17] Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Spring Harbor Laboratory Press.
- [18] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- [19] Kapustin, Y., Souvorov, A., Tatusova, T., & Lipman, D. (2008). Splign: algorithms for computing spliced alignments with identification of paralogs. *Biology Direct*, 3, 20. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-20>
- [20] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In J.M. Walker (ed.). *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571-607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- [21] Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D265-D268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>
- [22] Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., & Scheible, W. R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(1), 5-17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>

- [23] Min, T., Kasahara, H., Bedgar, D. L., Youn, B., Lawrence, P. K., Gang, D. R., Halls, S. C., Park, H., Hilsenbeck, J. L., Davin, L. B., Lewis, N. G., & Kang, C. (2003). Crystal structures of pinoresinol-lariciresinol and phenylcoumaran benzylic ether reductases and their relationship to isoflavone reductases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50714–50723. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308493200>
- [24] Markulin, L., Corbin, C., Renouard, S., Drouet, S., Gutierrez, L., Mateljak, I., Auguin, D., Hano, C., Fuss, E., & Lainé, E. (2019). Pinoresinol-lariciresinol reductases, key to the lignan synthesis in plants. *Planta*, 249(6), 1695–1714. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03137-y>
- [25] Saad, N., Ismail, N., Mastuki, S. N., Leong, S. W., Chia, S. L., & Abdullah, C. A. C. (2022). Chapter 16 - Rice bran oil main bioactive compounds and biological activities. In A. A. Mariod (ed.), *Multiple Biological Activities of Unconventional Seed Oils*. (pp. 195-213). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824135-6.00017-9>
- [26] von Heimendahl, C. B. I., Schäfer, K. M., Eklund, P., Sjöholm, R., Schmidt, T. J., & Fuss, E. (2005). Pinoresinol -lariciresinol reductases with different stereospecificity from *Linum album* and *Linum usitatissimum*. *Phytochemistry*, 66(11), 1254–1263. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.026>
- [27] Hemmati, S., von Heimendahl, C. B. I., Klaes, M., Alfermann, A. W., Schmidt, T. J., & Fuss, E. (2010). Pinoresinol - lariciresinol reductases with opposite enantiospecificity determine the enantiomeric composition of lignans in the different organs of *Linum usitatissimum* L. *Planta Medica*, 76(9), 928–934. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250036>
- [28] Chiang, N.-T., Ma, L.-T., Lee, Y.-R., Tsao, N.-W., Yang, C. -K., Wang, S.-Y., & Chu, F.-H. (2018). The gene expression and enzymatic activity of pinoresinol-lariciresinol reductase during wood formation in *Taiwania cryptomerioides* Hayata. *Holzforschung*, 73(2), 197–208. <https://doi.org/10.1515/hf-2018-0026>
- [29] Fujita, M., Gang, D. R., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (1999). Recombinant pinoresinol - lariciresinol reductases from western red cedar (*Thuja plicata*) catalyze opposite enantiospecific conversions. *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), 618–627. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.618>