

<b>Thesis Title</b>	Production of Gamma-Amino Butyric Acid From Germinated Rice Grain	
<b>Author</b>	Miss Panatda Jannoey	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Chemistry)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Assoc.Prof. Dr. Griangsak Chairote	Chairperson
	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Member
	Asst.Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup	Member

### ABSTRACT

Gamma-Amino Butyric Acid (GABA) has many pharmacological functions including being a major inhibitor and balancing neurotransmitter in mammal. GABA concentrations in rice grains and young leaves of seven well-known rice cultivars were studied during germination in this study. After germination of whole rice grains, hull and young leaves were removed and grains was used for consumption. Young leaves, waste from rice milling process, and germinated rice grains were collected for extraction with 70% ethanol and determination of GABA concentrations by LC-MS after 2-hydroxynaphthaldehyde (HN) derivative formation. It was found that, the GABA concentration in rice grains and young leaves were dramatically increased with germination days. However, young leaves contained more GABA than rice grains by 3 folds in all rice cultivars.

The highest GABA content was found to be at 2.01 mg/g in germinated grains of CN1 cultivars at 20 germination days. In view of young leave, 3.91 mg/g of GABA content was found at 20 germination days of SP1 cultivars. However, the long germination time period led to the the rice grains physiology that are not suitable for consumption.

The activity of glutamate decarboxylase (GAD) enzyme was increased in germinated rice grain, but the activity was lower than in young leave as determined by LC-MS and western blotting techniques

The accumulation of amino acid and protein profile were also studied during rice germination. The total content of 12 amino acids increased upon the development of the rice seedlings, directly related to the decrease of protein content after analysis by SDS-PAGE technique. Arginine, asparagine, isoleucine and leucine were found to be the major amino acids comparing to other amino acids in all rice cultivars.

In addition, two-dimensional (2D) gel electrophoresis technique was to study differential proteins expression of germinated rice comparing to the non germinated rice (control) of SPT1 and KDML105 cultivars. It was found that most of the proteins showed down-regulation in germinated rice of both represented cultivars. Only 3 protein spots of KDML105 and 2 spots of SPT1 showed significantly strong decreased expression in germinated rice with the same molecular weight of 51.96 kd.

The proteins expression and functions were characterized using the time of flight mass spectrometry (TOF-mass spectrometry) and LC/MS-MS techniques which provided their comparative, mass peptide fingerprint, molecular weight, and the similarity of amino acid sequence data. Identified 3 repressed protein spots in KDML105 were Os03g0793700, globulin2, and hypothetical protein OsI\_13867, whereas 2 spots of SPT1 showed the putative globulin [*Oryza japonicum*]. These proteins function related to nutrient reservoir storage protein during germination.

Data of the GABA accumulation, protein disappearance in rice produced by germination method, GAD activity and amino acid data were presented in this study. These results support and give the information for development of the effective uses of germinated rice grains for consumption and of rice leaves for pharmaceutical application. Also, identification of globulin2 storage protein disappearance is useful for the control of germination conditions and metabolism in order to provide a higher level of GABA in future studies.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดแอมมาอะมิโนบิวทีริกจากเมล็ดข้าวทิ้งอก	
ผู้เขียน	นางสาว ปนัดดา จันทร์เนย	
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. เกียรติศักดิ์ ไชยโรจน์	ประธานกรรมการ
	ศ.ดร. สายสมร ลำยอง	กรรมการ
	ผศ.ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์	กรรมการ

## บทคัดย่อ

กรดแอมมาอะมิโนบิวทีริก (กาบา) มีประโยชน์ในทางเภสัชกรรมที่หลากหลาย เช่น เป็นสารที่ช่วยยับยั้งและปรับสมดุลสารสื่อประสาทในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาปริมาณกาบาในเมล็ดและใบอ่อนของข้าวในระหว่างการงอกของข้าวเปลือกที่เป็นที่รู้จัก 7 สายพันธุ์ โดยหลังจากกระบวนการงอกของข้าวเปลือก เปลือกข้าวและใบอ่อนจะถูกแยกออกมา เพื่อนำเมล็ดข้าวทิ้งอกไปบริโภค

ในกระบวนการนี้ได้ใบอ่อนของข้าวที่ถูกกำจัดออกมาเป็นของเหลือทิ้ง ใบอ่อนของข้าวและเมล็ดข้าวที่งอกแล้วจะถูกนำมาสกัดด้วย 70% เอทานอลและหาปริมาณกาบาศด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) หลังจากทำให้เกิดอนุพันธ์ของสารประกอบ 2-hydroxyl-naphthaldehyde (HN) พบว่า ปริมาณกาบาในเมล็ดและใบอ่อนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการงอก และพบว่าในใบอ่อนของข้าวมีปริมาณกาบาที่มากกว่าในเมล็ด 3 เท่า ในข้าวทุกสายพันธุ์ที่ระยะเวลาการงอกเท่ากัน

ปริมาณกาบาที่พบสูงสุดในเมล็ดข้าวทิ้งอก เท่ากับ 2.01 mg/g ในข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ระยะเวลาการงอก 20 วัน เมื่อพิจารณาปริมาณกาบาที่พบสูงสุดในใบอ่อนเท่ากับ 3.91 mg/g ของข้าวสายพันธุ์

สุพรรณบุรี 1 ที่ระยะเวลาการงอก 15 วัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ระยะเวลาการงอกที่นานจะทำให้ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดข้าวไม่เป็นที่ยอมรับในการนำมาบริโภค

แอสดีวีตีของเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซิเลส ได้เพิ่มขึ้นในเมล็ดข้าวที่งอกแล้ว แต่ปริมาณน้อยกว่าในใบอ่อน หลังจากวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS และ Western blotting

การสะสมปริมาณของกรดอะมิโนและรูปแบบของโปรตีนในระหว่างการงอกของข้าวได้ถูกนำมาศึกษา กรดอะมิโนถูกสกัดจากใบอ่อนและในเมล็ดข้าวที่งอก นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS พบ กรดอะมิโน 12 ชนิด เพิ่มขึ้นตามการเจริญของต้นอ่อนของข้าว ในขณะที่รูปแบบโปรตีนกลับลดลง หลังจากวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และพบว่า อาร์จินีน แอสปาราจิน ไอโซลิวซีน และลิวซีน เป็นกรดอะมิโนที่พบในปริมาณมาก เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของกรดอะมิโนชนิดอื่น ของข้าวทุกๆ สายพันธุ์

นอกจากนี้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองมิติ ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าวงอก เปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่งอก ในข้าวสายพันธุ์ สันป่าตอง 1 และ ข้าวดอกมะลิ 105 พบโปรตีนส่วนใหญ่มีการแสดงออกที่ลดลงในข้าวหลังการงอกของทั้งสองสายพันธุ์ที่ถูกเลือกเป็นตัวแทนมาศึกษา ในการวิจัยนี้จึงเลือกเฉพาะจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างชัดเจนมา เท่ากับ 3 จุดของข้าวสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และ 2 จุด ของข้าวสายพันธุ์สันป่าตอง 1 ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากัน ประมาณ 51.96 kd

ลักษณะเฉพาะของโปรตีนโปรตีนที่แสดงออกที่แตกต่างนี้ ถูกบ่งบอกลักษณะและชื่อโปรตีนด้วยเทคนิค TOF-masspectrometry และ LC/MS-MS ซึ่งจะให้ข้อมูลรูปแบบของ Mass spectrum, มวลโมเลกุล และลำดับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน พบว่า โปรตีนทั้งที่ลดลงทั้ง 3 ชนิด ของข้าวสายพันธุ์ ข้าวดอกมะลิ 105 คือ Os03g0793700, globulin2, hypothetical protein OsI\_13867, ขณะที่พันธุ์สันป่าตอง 1 พบโปรตีน putative gl bulin [*Oryza japonicum*] ทั้ง 2 จุด ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีหน้าที่เหมือนคือ เกี่ยวข้องกับการสะสมอาหารในเมล็ดในระหว่างการงอก

ในการวิจัยในครั้งนี้ได้นำเสนอข้อมูลของการเพิ่มและลดลงของปริมาณกาบาในข้าวในระหว่าง การงอก แอคติวิตีของเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซีเลส และข้อมูลของกรดอะมิโน จึงจะช่วยสนับสนุนการตัดสินใจและเป็นความรู้ในการพัฒนาการนำเมล็ดข้าวที่งอกแล้วไปรับประทาน และนำไปอ่อน ของข้าวไปประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม และจากข้อมูล globulin 2 ที่พบว่าแสดงออกอย่างลดลง ในข้าวที่มี กาบาสูงนี้จะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการนำไปควบคุมกระบวนการงอกของข้าว เพื่อช่วยในการหาทางควบคุมและยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องในระหว่างการงอกเพื่อให้ข้าวผลิตกาบาในปริมาณที่เพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 Copyright© by Chiang Mai University  
 All rights reserved