



รายงานการวิจัย

เรื่อง

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซิเลส

ปนัดดา จันทร์เนย

พ.ศ. 2553

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม  
งบประมาณ 50,000 ประจำปี 2553 และสำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย

ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ  
ชั้นสูง HPLC และอุปกรณ์พื้นฐานสำหรับการทำวิจัยและเครื่อง western blotting  
ที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ขอขอบคุณ คุณสุรเดช ปาละวิสุทธิ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลกที่ให้ความ  
อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวพิษณุโลก 2

ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ช่วยกรุณาตรวจและแก้ไขงานวิจัยเล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์  
มากยิ่งขึ้น

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยให้กำลังใจ และให้เวลามาทำงานวิจัย  
อย่างเต็มที่ ตลอดจนให้การสนับสนุนทุกๆด้าน

นางสาว ปนัดดา จันทร์เนย



**Title** Factors effecting on glutamate decarboxylase enzyme activity  
**Researcher** Dr. Panatda Jannoey  
**Year** Pibulsongkram Rachabut University Research Foundation, 2011

### **Abstract**

This research was studied the factors effect on germinated rice glutamate decarboxylase (GAD) enzyme activity. GAD enzyme from germinated rice was extracted and acting as biocatalyst in bioconversion for GABA production reaction. GABA is a neurotransmitter, increased learning ability, antihypertension and help for relaxing. Western blotting technique using anti-GAD antibody for specify attached with GAD-protein in germinated rice. It was found, the expression of GAD protein in germinated rice higher than non germinated rice with 70.8 Kd. Optimum condition for GAD activity depend on glutamic concentration, temperature and pH. The highest activity was found at 3.42 Unit (umol/min) at 40 min, pH 6 with PLP coenzyme.

Optimum condition of GAD enzyme activity was using as catalyst data for GABA production reaction in test tube. The amount of GABA was found 1.43 mg/g . Theses method provide GABA higher than those GABA which extract from germinated rice at 11.7 fold.

This research provide useful GAD enzyme data will be applied in food and pharmaceutical industry. The consumer who interests consume germinated rice with high GABA content can be applied in daily life.

## สารบัญ

	หน้า
กิติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 สมมุติฐานการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	4
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเอนไซม์	5
2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์	6
2.3 การจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์	8
2.4 เอนไซม์กลูตาเมทดีคาร์บอกซีเลส	11
2.5 ความสำคัญของกาบา	12
2.6 กระบวนการเมตาบอลิซึมของกาบา	13
2.7 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของกาบา	14
2.8 กระบวนการงอกของข้าว	15
2.9 เทคนิคการติดตามการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมทดีคาร์บอกซีเลสและ GAD protein	19
2.10 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	25
2.11 สถานการณ์ข้าวกล้องงอกในประเทศไทยและต่างประเทศ	27

<b>สารบัญ (ต่อ)</b>	<b>หน้า</b>
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย</b>	29
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	28
3.3 วิธีทดลอง	31
3.3.1 การรอก	31
3.3.2 การสกัดกาบา	31
3.3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	31
3.3.3.1 การสกัดเอนไซม์	31
3.3.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลส	31
3.3.3.3 การหากิจกรรมของ GAD เอนไซม์ในข้าวที่งอก	34
3.3.4 การหาปริมาณกาบา	34
3.3.4.1 การวิเคราะห์กาบาด้วย HPLC	34
3.3.5 การใช้เทคนิค Western blotting ในการวิเคราะห์ GAD protein	35
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัย</b>	41
4.1 การติดตามการแสดงออกของเอนไซม์กลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลส	41
4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์กลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลส	42
4.2.1 ค่า pH ที่เหมาะสม	43
4.2.2 ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม	43
4.2.3 ปริมาณสับสเตรทและเวลาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสม	43
4.3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนจากกรดกลูตามิกเป็นกาบาโดยใช้เอนไซม์กลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลส	44
4.4 ปริมาณกาบาที่สกัดจากข้าวที่กำลังงอก	45
4.5 เปรียบเทียบปริมาณกาบาจากการสกัดโดยตรงและจากการทำปฏิกิริยา bioconversion	45
<b>บทที่ 5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ</b>	47
5.1 การติดตามการแสดงออกของ GAD protein โดยใช้เทคนิค Western blotting	47
5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรม (activity) ของ GAD enzyme	47
5.3 ปริมาณกาบาที่พบในข้าวที่งอก	48
5.4 เปรียบเทียบปริมาณกาบา	50
<b>บรรณานุกรม</b>	52
<b>ประวัติผู้วิจัย</b>	56

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 2.1	การจำแนกชนิดเอนไซม์	9
ตารางที่ 2.2	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดอะมิโนและสารประเภทเอไมด์ในระหว่างการงอก	17
ตารางที่ 2.3	เทคนิคอื่นๆที่ใช้ในการติดตามการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมทดีคาร์บอกซีเลสเอนไซม์	24
ตารางที่ 3.1	สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ที่แตกต่างกัน เพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์	32
ตารางที่ 3.2	ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันภายใต้สภาวะที่สับสเตรทคงที่ และ pH 6	33
ตารางที่ 3.3	ปริมาณ L-glutamic acid (สับสเตรท) ที่แตกต่างกันในปฏิกิริยาที่เร่งด้วย GAD เอนไซม์	33
ตารางที่ 3.4	ปริมาณของสารละลายที่จะใช้ในการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford assay	35
ตารางที่ 3.5	ส่วนผสมที่ใช้เตรียม 10% separating gel และ stacking gel solution	36
ตารางที่ 4.1	ปริมาณกาบาที่พบหลังจากใช้เอนไซม์ที่สกัดจากข้าวที่งอกที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน	44
ตารางที่ 4.2	ปริมาณกาบาที่สกัดได้จากข้าวที่งอกที่ระยะเวลาการงอกแตกต่างกัน	45

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
รูปที่ 1.1	การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูตาเมตคาร์บอกซีเลส	1
รูปที่ 1.2	สูตรโครงสร้าง GABA	2
รูปที่ 2.1	การเปรียบเทียบระหว่าง (ก) ปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวเร่งปฏิกิริยา (ข) ปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์	5
รูปที่ 2.2	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของสับสเตรทและอัตราเร็วเริ่มต้น	6
รูปที่ 2.3	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ [E] กับอัตราเร็วของปฏิกิริยา	7
รูปที่ 2.4	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา	7
รูปที่ 2.5	pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ	8
รูปที่ 2.6	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดกลูตามิกไปเป็นกาบา	12
รูปที่ 2.7	วิธีเมตาบอลิซึมการเกิดกาบาโดยทั่วไป (a) เมตาบอลิซึมของกาบาที่เชื่อมโยงกับวิธีอื่น (b) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิธีเมตาบอลิซึมของกาบาโดยจะเน้นสีเทา	14
รูปที่ 2.8	วิธีเมตาบอลิซึมของกาบาที่พบในไมโทคอนเดรีย	15
รูปที่ 2.9	การงอกของข้าว (1) coleoptiles (2) Phophyll (3) Coleorhiza	16
รูปที่ 2.10	รูปแบบของโปรตีนของข้าวในระหว่างการงอกโปรตีนลดลงหลังจากกระบวนการงอกเพิ่มขึ้น	18
รูปที่ 2.11	การสะสมของสารประกอบไนโตรเจน เช่น โปรตีน และเอไมด์ ในเอนโดสเปิร์มระหว่างการงอกของข้าว	19
รูปที่ 2.12	การติดตามการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมตคาร์บอกซีเลส (GAD activity) โดยเทคนิค HPLC	20
รูปที่ 2.13	แผ่นเจลของ SDS-PAGE และ แผ่นเมมเบรน Western-blot analyses of RiceGAD-encoded protein expression	22
รูปที่ 2.14	แสดงตำแหน่งที่พบเอนไซม์กลูตาเมตคาร์บอกซีเลส จะมีลักษณะเป็นแถบสีดำเนื่องจากการเรืองแสงขนาด 74 และ 78 Kd	23

## สารบัญรูป (ต่อ)

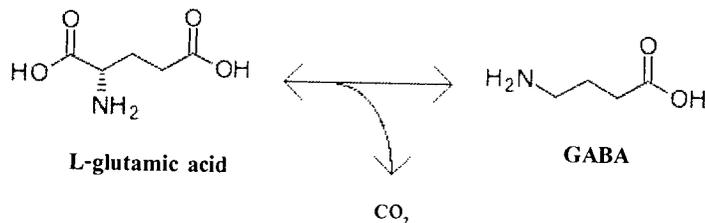
รูปที่		หน้า
รูปที่ 3.1	เครื่อง gel electrophoresis	36
รูปที่ 3.2	การใส่ sample ลงในช่องที่เตรียมไว้ของเครื่อง gel electrophoresis	37
รูปที่ 3.3	การต่อเข้ากับขั้วไฟฟ้าของเครื่อง SDS-PAGE สำหรับแยกโปรตีน	37
รูปที่ 3.4	การเตรียมเมมเบรนและการเตรียมเครื่อง transfer cell ก่อนทำ western blotting	38
รูปที่ 3.5	ขั้นตอนการทำให้เมมเบรนปราศจากโปรตีนชนิดอื่น (membrane blocking)	39
รูปที่ 3.6	สรุปแผนผังการดำเนินงานวิจัย	40
รูปที่ 4.1	แถบของ GAD protein ที่ปรากฏหลังจากการจับจำเพาะของ GAD antibody	41
รูปที่ 4.2	ค่า pH ที่แตกต่างกันที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตกาบาของเอนไซม์กลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลส	42
รูปที่ 4.3	ผลของการใช้ปริมาณเอนไซม์กลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลสที่ต่างกันใน การเร่งปฏิกิริยาการผลิตกาบา	43
รูปที่ 4.4	ผลของการใช้ปริมาณ सबстратและเวลาการเร่งปฏิกิริยาที่ต่างกันในของเอนไซม์กลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลส	44
รูปที่ 4.5	ปริมาณกาบาที่ได้จากสองวิธีที่ต่างกัน, ■ = ปริมาณกาบาที่ได้จากการสกัดจากข้าวที่กำลังงอก ขณะที่ □ = ปริมาณกาบาที่ได้จากการใช้เอนไซม์กลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลสเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะที่เหมาะสม	46

# บทที่ 1

## บทนำ

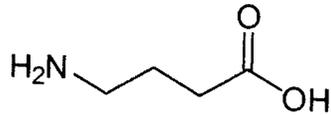
### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนไซม์กลูตามาเมตดีคาร์บอกซีเลส (glutamate decarboxylase; GAD) (EC 4.1.1.15) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์กาบา (GABA) โดยมีกรดกลูตามิก (glutamic acid) เป็นสารตั้งต้นมี pyridoxal 5-phosphate (PLP) เป็นโคเอนไซม์ ดังสมการที่แสดงในรูปที่ 1.1 GAD เอนไซม์ชนิดนี้จึงเป็นสิ่งที่ควบคุมในการผลิตกาบาของสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Komatsuzaki, *et al.*, 2005)



รูปที่ 1.1 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูตามาเมตดีคาร์บอกซีเลส (Enzyme database. 2009. "GABA structure" [online]. Available [http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=information/all\\_enzymes.php4?e\\_no=1.2.1.24](http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=information/all_enzymes.php4?e_no=1.2.1.24)

กาบาที่เป็นผลผลิตของเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นนี้ กำลังได้รับความสนใจในปัจจุบัน มีชื่อเต็มเรียกว่า Gamma-Amino Butyric Acid ; GABA มีคุณสมบัติและโครงสร้างคล้ายกรดอะมิโนแต่ไม่ใช่กรดอะมิโน (non-protein amino acid) มีหมู่อะมิโนติดกับคาร์บอนที่ตำแหน่ง  $\gamma$ -carbon มากกว่าที่จะอยู่ที่ตำแหน่ง  $\alpha$ -carbon ดังนั้นจึงเรียกว่า Gamma-Amino Butyric Acid ดังโครงสร้างแสดงในรูปที่ 1.2 มีความสามารถละลายในน้ำได้ดี มีจุดหลอมเหลวสูงถึง 203.7 °C จึงเหมาะสมที่จะนำกาบามาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา เพราะมีจุดหลอมเหลวสูงจึงสลายตัวได้ยากในกระบวนการผลิตอาหารหรือยาที่ต้องผ่านการให้ความร้อน (Takahashi *et al.*, 2004; Komatsuzaki *et al.*, 2005;2007; Su *et al.*, 2003; Park and Oh, 2007; Siragusa *et al.*, 2007; Aoki *et al.*, 2003, Kono and Himeno, 2000; Shelp *et al.*, 1999)



รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้าง GABA (*Enzyme database. 2009. "GABA structure" [online]. Available [http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=information/all\\_enzymes.php4?eno=1.2.1.24](http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=information/all_enzymes.php4?eno=1.2.1.24)*)

ในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะสัตว์ชั้นสูงเช่น ในสมองของสัตว์เลี้ยงรูปด้วยนม จะมีกาบาไว้เพื่อเป็นสารสื่อประสาท ช่วยปรับสมดุลการทำงานของสารสื่อประสาท ทำให้สมองทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ มีรายงานการวิจัยที่พบว่า หนูที่เป็นสัตว์ทดลองเมื่อได้รับอาหารที่มีกาบาสูงพบว่า หนูมีความสามารถในการเรียนรู้และมีความจำที่มากขึ้น (Aoki *et al.*, 2003).

กาบายังมีประโยชน์ที่น่าสนใจอื่นๆ เช่น เป็นสารที่ช่วยลดความดันในเลือด มีรายงานการวิจัยเมื่อเร็วๆ นี้ที่พบว่า กาบาทำให้การหลั่งฮอร์โมนอินซูลินมากขึ้น จึงช่วยป้องกันการเกิดโรคเบาหวาน (Huang *et al.*, 2007, Siragusa *et al.*, 2007). สามารถช่วยควบคุมการเกิดโรคหัวใจ เช่น ควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจ การความดันเลือดของหัวใจเป็นต้น (Park and Oh, 2007) ช่วยลดความวิตกกังวลทำให้อนอนหลับได้ดีและช่วยทำให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันที่มากขึ้น (Siragusa *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่พบว่า เมื่อนำสารสกัดจากข้าวที่มีกาบาสูงมาใช้ทดลองกับหนู พบว่ากาบาสามารถยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งได้ (Park and Oh, 2006)

เนื่องจากกาบามีประโยชน์ต่อสุขภาพ ตามที่กล่าวมาข้างต้นนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะผลิตกาบา แต่อย่างไรก็ตามการเกิดกาบานั้นจะต้องอาศัย GAD เอนไซม์ ที่เป็นตัวที่ควบคุมการผลิต จึงสนใจที่จะศึกษาปัจจัย และควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ เพื่อนำไปสู่การควบคุมการผลิตกาบาให้ได้ปริมาณตามที่เราต้องการ

อย่างไรก็ตาม GAD เอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดสารกาบานี้พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ยกตัวอย่างเช่น ในพืช พบมากในใบชา ยอดใบชา และใบชาหมัก ในสาหร่ายคอเรลลา (Komatsuzaki *et al.*, 2007; Park and Oh, 2007; Siragusa *et al.*, 2007; Aoki *et al.*, 2003), ในจมูกข้าวที่แช่ในน้ำ และในต้นอ่อนของข้าว (Takahashi *et al.*, 2004; Komatsuzaki *et al.*, 2005), ในถั่วเหลืองที่กำลังออก พบในจุลินทรีย์ เช่น แลกคิกแอสิด (Komatsuzaki *et al.*, 2005), เชื้อราจำพวก; *Monascus* sp (Su *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2007), *Rhizopus*, *Aspergillus oryzae* (Aoki *et al.*, 2003; Kono and Himeno 2000) และ พบในยีสต์ (Takahashi *et al.*, 2004).

ซึ่งถ้ากล่าวโดยสรุปแล้ว ในสิ่งมีชีวิตใดที่พบสารกาบา ก็มักจะพบเอนไซม์ชนิดนี้ด้วยนั่นเอง แต่จะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสภาวะและชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้น

งานวิจัยนี้สนใจที่จะสกัดเอนไซม์ GAD ออกจากเมล็ดข้าวที่กำลังงอกพันธุ์พิษณุโลก 2 เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดจากข้าวสายพันธุ์นี้ เนื่องจากยังไม่พบรายงานวิจัยที่ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ GAD จากข้าวที่กำลังงอกในสายพันธุ์ในประเทศไทย ยกเว้น การสกัดและหาสภาวะที่เหมาะสมของ GAD ที่สกัดจากต้นอ่อนของข้าวสายพันธุ์ประเทศจีน (Zhang, et al 2007) และเนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ GAD นี้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ข้าว (Saikura, et al., 1994) จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในทุกครั้งที่สกัดออกมาออกเซลล์ เพื่อให้มีฐานข้อมูลที่เป็นงานวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ GAD ในข้าวสายพันธุ์พิษณุโลก 2 อีกทั้งจะเป็นข้อมูลในการนำเอนไซม์ GAD ไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูตามิกเป็นกาบาภายในหลอดทดลอง

งานวิจัยนี้จะแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมา ที่เป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมและปรับปรุงกรรมวิธีการงอกของข้าวเพื่อให้ข้าวผลิตกาบามากที่สุด (พัชรและคณะ 2550., Srisang, et al., 2011, Limure, et al., 2009, , Komatsuzaki, et al., 2007, Saikura, et al., 1994) โดยกาบาที่ผลิตได้จะยังคงอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ แต่งานวิจัยนี้จะเป็นการหาสภาวะเพื่อผลิตกาบาภายในหลอดทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับผู้สนใจที่นำกาบาผงที่ได้ไปประยุกต์ใช้เติมลงไปในการ เช่นงานวิจัยที่ผ่านมาได้เพิ่มปริมาณในระหว่างการหมักแป้งสาธิตเพื่อทำขนมปัง (Joye, et al, 2011) และเติมลงไป ใน breakfast cereal (Lambert, et al., 2012) เป็นต้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- (1) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ GAD เอนไซม์ที่สกัดมาจากข้าวที่งอก
- (2) เพื่อที่จะนำสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ GAD เอนไซม์ ไปใช้ในการผลิตกาบาในหลอดทดลองโดยใช้กลูตามิกเป็นสารตั้งต้น (bioconversion)

## 1.3. สมมุติฐานการวิจัย

- (1) สามารถสกัดเอนไซม์กลูตามิเคอัสจากเมล็ดข้าวได้
- (2) ข้าวที่กำลังงอกจะมีการแสดงออกโปรตีนของเอนไซม์กลูตามิเคอัสบอกลีเซลมากกว่าข้าวที่ไม่งอก

(4) สามารถนำสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตามาเทคทีคาร์บอกซีเลส มาประยุกต์ใช้ในการเพาะข้าวเพื่อผลิตข้าวกาบาปริมาณสูงและนำมาใช้ในกระบวนการ bioconversion เพื่อผลิตกาบา

#### 1.4 ขอบเขตการวิจัย

- (1) ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง
- (2) ทดลองสกัดเอนไซม์กลูตามาเทคทีคาร์บอกซีเลส จากข้าวที่กำลังงอก แล้วทดสอบการมีเอนไซม์ชนิดนี้ในข้าวที่กำลังงอก โดยดูการแสดงออกของโปรตีน GAD โดยใช้เทคนิค Western blotting ที่ติดตามการแสดงออกของโปรตีน โดยการจับด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะ
- (3) ทดลองหาสภาวะและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตามาเทคทีคาร์บอกซีเลส เช่น ปริมาณของเอนไซม์ ปริมาณของสับสเตรท ค่า pH และ อุณหภูมิ
- (4) นำสภาวะที่เหมาะสมไปประยุกต์ใช้ผลิตสารกาบาในหลอดทดลอง (bioconversion) โดยใช้กรดกลูตามิกเป็นสารตั้งต้นและเร่งการทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ที่สกัดได้
- (5) เปรียบเทียบปริมาณกาบาที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์และกาบาที่ได้จากการสกัด

#### 1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

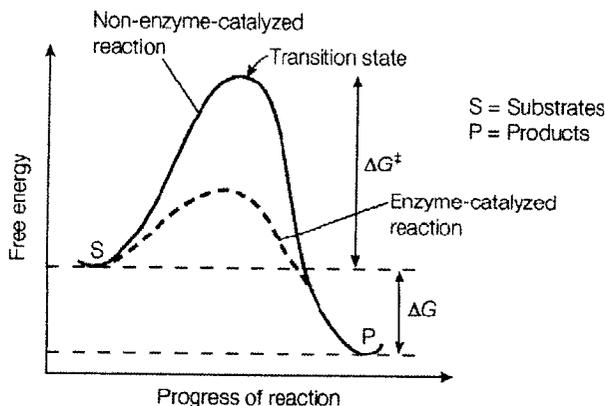
- (1) สามารถตีพิมพ์หรือเผยแพร่ผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์ได้ 1 เรื่อง
- (2) หน่วยงานและประชาชนที่สนใจ สามารถที่จะนำผลการวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้ได้
- (3) ข้อมูลที่ได้จะเป็นพื้นฐานของการศึกษาเอนไซม์กลูตามาเทคทีคาร์บอกซีเลสต่อไป

## บทที่ 2

### แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเอนไซม์

เอนไซม์ (enzyme) คือ ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (biological catalyst) ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาให้มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้นประมาณ  $10^6$  ถึง  $10^{12}$  เท่า โดยจะทำหน้าที่ลดพลังงานกระตุ้น ( $G$ ) ในการเกิดปฏิกิริยาให้ลดลง รูปที่ 2.1 สิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะดำรงชีวิตอยู่ได้โดยมีเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยเร่งและควบคุมปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biocatalyst) ที่เกิดขึ้นภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต



รูปที่ 2.1 การเปรียบเทียบระหว่างค่าพลังงานอิสระของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ (เส้นประ.....) และไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (เส้นทึบ ——)

เอนไซม์ต่างจากตัวเร่งที่เป็นสารเคมี เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อปฏิกิริยาสูงมาก เนื่องจากเอนไซม์จะเลือกทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารตั้งต้นหรือสับสเตรท (substrate) ที่มีโครงสร้างเหมาะสมกับโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ เหมือนกับลูกกุญแจที่มีโครงสร้างเหมาะสมกับแม่กุญแจ ซึ่งเราเรียกทฤษฎีนี้ว่า ทฤษฎีแม่กุญแจ-ลูกกุญแจ (lock-and-key) สามารถเขียนสมการแสดงกลไกอย่างง่ายในการทำงานของเอนไซม์ได้ดังนี้



การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีการรวมตัวกันของ เอนไซม์-สารตั้งต้น (ES) (สมการ 1)

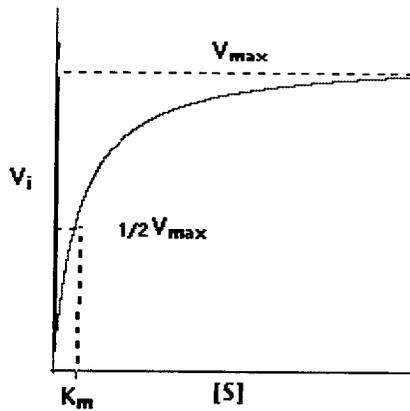
ซึ่งเป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นได้เร็ว แต่การสลายตัวของ ES เพื่อไปเป็นโมเลกุลของเอนไซม์และผลิตภัณฑ์นั้น (สมการ 2) เกิดขึ้นได้ช้า ในขั้นที่ 2 จึงเป็นขั้นกำหนดอัตรา

## 2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

อัตราความเร็วของปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยดังนี้

### (1) ความเข้มข้นของสับสเตรท [S]

เมื่อให้ปริมาณเอนไซม์คงที่แล้วค่อยๆ เพิ่มปริมาณสับสเตรทขึ้นพบว่า อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกๆ จนกระทั่งเพิ่มสับสเตรทขึ้นจนถึงระดับหนึ่งจากนั้นไม่ว่าจะเพิ่มสับสเตรทมากขึ้นเท่าไร อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสับสเตรทที่ให้อัตราเร็วสูงสุด ( $V_{max}$ ) เรียกความเข้มข้นอิ่มตัวของสับสเตรท สำหรับค่า  $K_m$  (Michaelis constant) มีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสับสเตรทที่ให้อัตราเร็วเริ่มต้น ( $V$ ) เท่ากับ  $V_{max}/2$  ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของสับสเตรทและอัตราเร็วเริ่มต้น

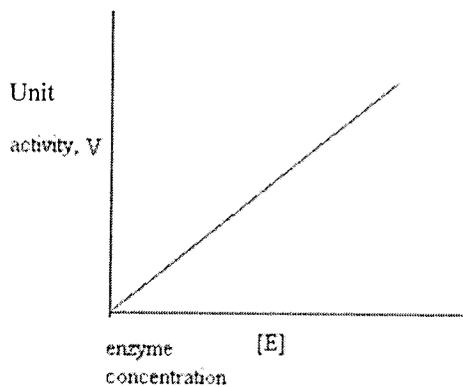
### (2) ความเข้มข้นของเอนไซม์ [E]

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีการรวมตัวกันของ เอนไซม์-สารตั้งต้น (ES) อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโมเลกุล ซึ่งจะเข้มข้นมากขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์หรือสารตั้งต้นมากขึ้น ถ้ามีสารตั้งต้นพอเพียง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นสองเท่าจะทำให้อัตราเร็วเพิ่มขึ้นไปเป็น 2 เท่า แต่เมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อไปเรื่อยๆ อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มคงที่เพราะสารตั้งต้นเริ่มหมดไป ทำให้เป็นตัวจำกัดการเกิดปฏิกิริยาได้

อัตราการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นนั้น ถ้าให้เอนไซม์เป็นตัวคงที่และเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นขึ้นเรื่อยๆ นั้น ปฏิกิริยาได้เป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นสัดส่วน

โดยตรงต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้น: ระยะที่ 2 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มลดลงเนื่องจากปริมาณของเอนไซม์เริ่มเป็นตัวจำกัด, ระยะที่ 3 อัตราเร็วถึงจุดอิ่มตัวที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของสารตั้งต้นพบว่าอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ และได้กราฟเป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 2.3

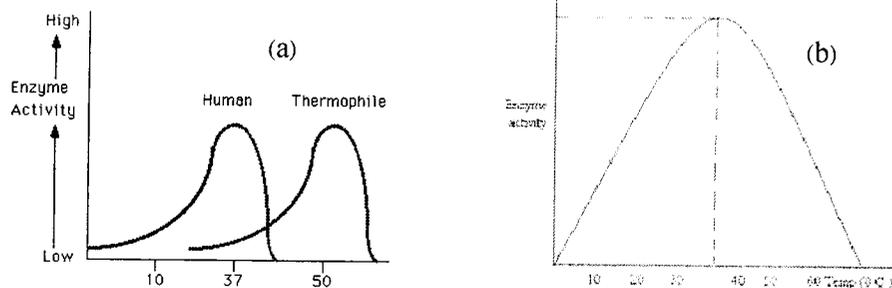
เมื่อปฏิกิริยาเกิดที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของสับสเตรท อัตราความเร็วเริ่มต้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในหน่วยที่ใช้วัดปริมาณเอนไซม์ ได้แก่ ยูนิท (U) ของเอนไซม์ มีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งให้ซับสเตรทหนึ่งไมโครโมล ( $10^{-6}$  โมล) เปลี่ยนเป็นผลผลิตในเวลาหนึ่งนาทีที่อุณหภูมิที่เร่งปฏิกิริยา



รูปที่ 2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ [E] กับอัตราเร็วของปฏิกิริยา

### (3) อุณหภูมิ

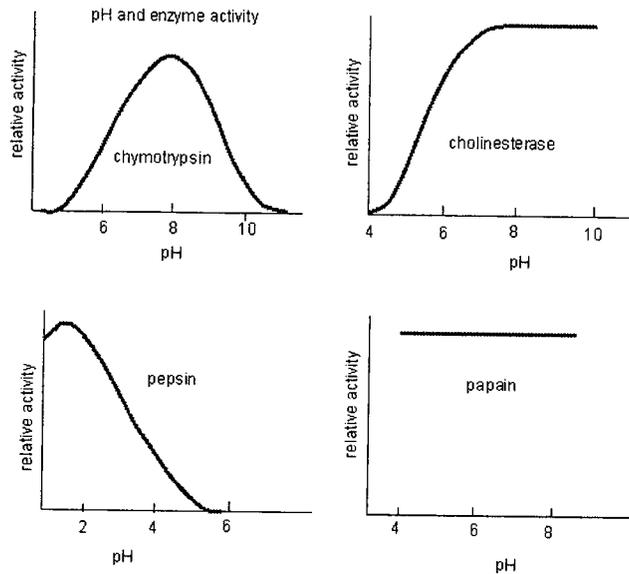
เอนไซม์โดยทั่วไปอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า  $40^{\circ}\text{C}$  อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มลดลงเนื่องจากเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ (รูปที่ 2.4 a) ยกเว้นเอนไซม์พวก thermophile bacteria ที่สามารถต่อความร้อนได้สูงกว่าเอนไซม์ทั่วไป สามารถทำงานได้ดีแม้อุณหภูมิสูงถึง  $50-85^{\circ}\text{C}$  (รูปที่ 2.4 a) แต่ในร่างกายคนปกติอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ  $37.5^{\circ}\text{C}$  (รูปที่ 2.4 b)



รูปที่ 2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

#### (4) สภาพกรด-เบส (pH)

pH มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เพราะ ค่า pH ทำให้แขนงข้างของกรดอะมิโนบริเวณเร่งของเอนไซม์มีประจุเปลี่ยนไป ทำให้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ นอกจากนี้ถ้า pH สูงหรือต่ำมาก อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติของโครงสร้างได้ pH ที่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเรียกว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimum pH) ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีค่า pH ที่เหมาะสม (pH optimum) ไม่เท่ากัน ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

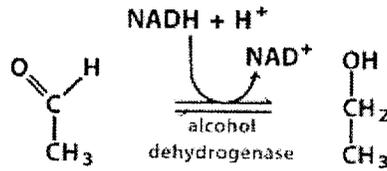
(*[online]. Available at* <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/transkinetics/olinhibition.html>)

#### 2.3 การจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์

เอนไซม์หลายชนิดมีชื่อตามสับสเตรทของปฏิกิริยาที่เร่งโดยลงท้ายด้วย เอส (-ase) ข้างท้ายชื่อสับสเตรท เช่น เอนไซม์ยูรีเอสมีสับสเตรทเป็นยูเรีย ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำของยูเรีย แต่ถ้าสับสเตรทเป็นอาร์จินีนและไทโรซีน เอนไซม์ที่เร่งการเปลี่ยนแปลงของสารเหล่านี้คือ อาร์จินเนสและไทโรซิเนส ตามลำดับ เอนไซม์บางชนิดได้ชื่อตามปฏิกิริยาที่เร่ง เช่น ดีคาร์บอกซิเลส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาดิคาร์บอกซิเลสชัน เอนไซม์อีกจำนวนมากมีชื่อซึ่งไม่ได้ตั้งตามระบบ เช่น เพปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin)

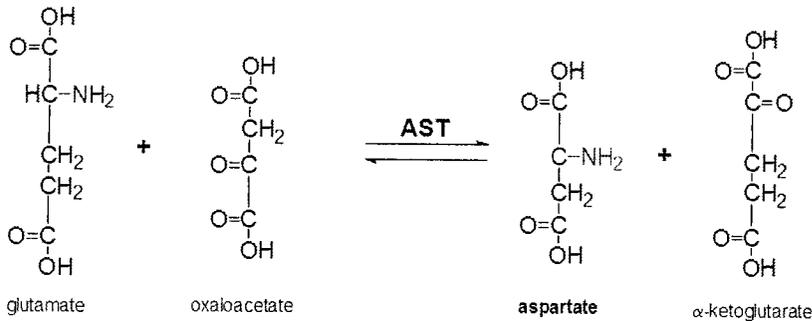


**กลุ่ม 1 : Oxidoreductase :** เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยา oxidation – reduction

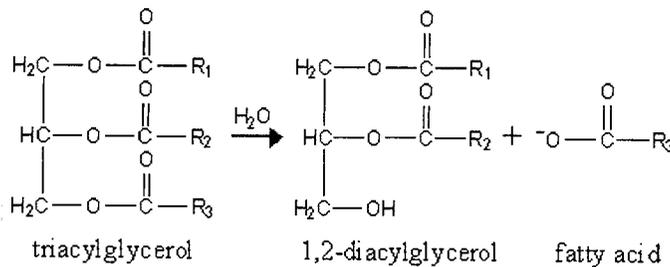


ยกตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาการเปลี่ยน acetaldehyde เป็น ethanol โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมี NADH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub> เป็นโคเอนไซม์

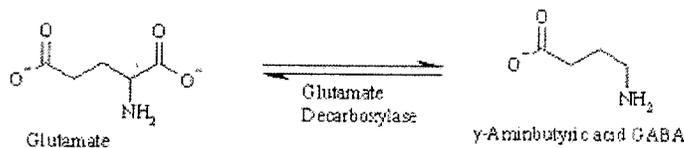
**กลุ่ม 2 : Transferase** เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่ amino, acyl phosphate, C-atom, glycosyl ยกตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาการย้ายหมู่ amino ของกรดอะมิโนกลูตาเมต ไปให้กับแอสปาเตท ไปให้ oxaloacetate โดยการเร่งของเอนไซม์ Aspartate transferase (AST)



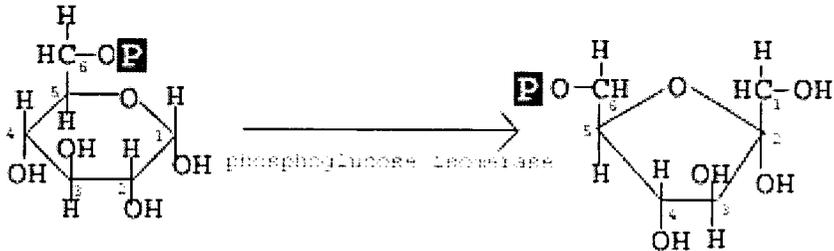
**กลุ่ม 3 : Hydrolase** เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาการแตกพันธะของ C-O, C-N, O-P, C-S เช่น ปฏิกิริยาการย่อยพันธะ C-O ของโมเลกุล tri-acyl glycerol ให้ได้เป็น 1,2 diacylglycerol และ fatty acid โดยการเร่งของเอนไซม์ไลเปส



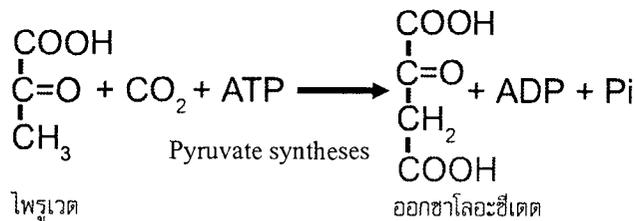
**กลุ่ม 4 : Lyase:** เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาการเติม หรือการย้าย CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O เช่น ปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดกลูตามิกเป็นกาบา เช่น เอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซิเลส



กลุ่ม 5 : Isomerase: เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน isomer เช่น Cis-Trans



กลุ่ม 6 : Lygase: เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อโมเลกุล 2 โมเลกุลเข้าด้วยกัน โดยอาศัยพลังงานจาก ATP โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้จะลงท้ายด้วยซินเทส (synthases) เช่น ปฏิกิริยาการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ให้กับไพรูเวตแล้วได้เป็นออกซาโลอะซีเตต



#### 2.4 เอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลส

เอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลสจัดอยู่ในกลุ่ม 4 คือ lyases และมี subclass ดังแสดงด้านล่างนี้ จึงทำให้มีเลข EC number เป็น EC 4.1.1.15

EC 4 - Lyases

EC 4.1 - Carbon-Carbon Lyases

EC 4.1.1 - Carboxy-Lyases

EC 4.1.1.15 - Glutamate decarboxylase

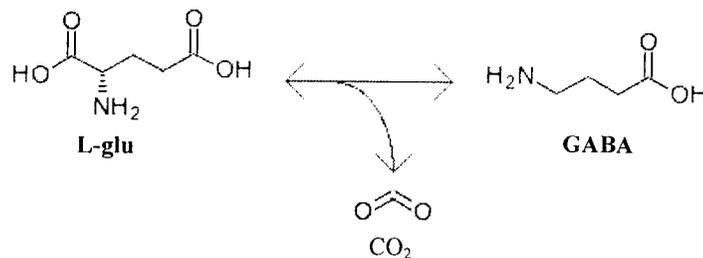
เมื่อสกัดเอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลสจากข้าวและทำบริสุทธิ์ พบว่าเป็นเอนไซม์ที่มีขนาด 40 kd และมีช่วง pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 40°C ค่า Km สำหรับการใส่กรดกลูตามิก และการใช้ PLP เป็นโคเอนไซม์ พบที่ 32.3 mM และ 1.7 l M, ตามลำดับ (Zhang *et al.*, 2007). แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลสยังไม่แน่ชัดบางรายงานการวิจัยพบที่ 76 Kd (Akama and Takaiwa, 2007). และจากการสกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลสจากพืชชนิดอื่น เช่น ต้นอ่อนข้าวบาร์เลย์พบขนาดของ

เอนไซม์สองขนาด 256 and 120 Kd form, และรากของข้าวบาร์เลย์ พบว่ามีขนาด 310 Kd (Inatomi and Slaughter, 1975) ส่วนเอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลสที่แยกได้จากฟักทองมีขนาด 58 Kd (Matsumoto *et al.*, 1986)

อย่างไรก็ตามการหากิจกรรมของเอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลส (activity) หรือ การทำงานของเอนไซม์ เริ่มต้นในปี ค.ศ 1964 โดย Bautista ต่อมา Saikura *et al.*, 1994 พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของข้าว และพบว่าการแช่ข้าวในสถานะที่เป็นกรด ข้าวผลิตกาบาได้ปริมาณมาก นั้นแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลสทำงานได้ดีในสถานะที่เป็นกรด จากการค้นพบในครั้งนี้ ทำให้มีการพัฒนากระบวนการงอกของข้าวให้ง่ายและผลิตกาบาในปริมาณมากเพื่อพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพและป้องกันโรคความดันโลหิตสูง (Ohtsubo *et al.*, 2005; Saikura *et al.*, 1994; Komatsuzaki *et al.*, 2007)

เพื่อให้เข้าใจเอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลสมากยิ่งขึ้น, Akama and Takaiwa, (2007) ได้แยก cDNA จากข้าวที่แสดงออกเป็นเอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลส พบว่า เอนไซม์ชนิดนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 ไอโซไซม์ คือ OsGAD1 และ OsGAD2 ซึ่งแตกต่างกันที่ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ โดย OsGAD1 นั้นจะประกอบไปด้วย calcium calmodulin (CaMBD) ที่บริเวณ C-terminal เหมือนกับพืชใบเลี้ยงคู่ชนิดอื่น ในขณะที่ OsGAD2 ไม่มี CaMBD เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งสองไอโซฟอร์มยังแตกต่างกันที่บริเวณ exon/intron ทำให้มีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน เช่น ที่บริเวณรากและเมล็ดที่โตเต็มวัย

อย่างไรก็ตาม, Akama *et al.*, (2001) พบว่าเอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลสในข้าว ไม่มี CaMBD ที่บริเวณ C-terminus จึงจัดเป็น OsGAD2 และสามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดกลูตามิกไปเป็นกาบาดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดกลูตามิกไปเป็นกาบา (GenomeNet Database Resources.

"Glutamate decarboxylase". 2009. [online]. Available

[http://www.genome.jp/dbgetbin/www\\_bget?K00823+2.6.1.19+R01648](http://www.genome.jp/dbgetbin/www_bget?K00823+2.6.1.19+R01648)

## 2.5 ความสำคัญของกาบา

การบาเป็นสารที่ทำให้ข้าวกล้องงอกมีความสำคัญต่อการบริโภค มีสูตรทางเคมีคือ  $C_4H_9NO_2$  กาบานี้ผลิตจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของกรดกลูตามิก ตามที่กล่าวมาข้างต้น กาบามีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง นอกจากนี้กabayังถือเป็นสารสื่อประสาทประเภทสารยับยั้ง (inhibitor neurotransmitter) โดยจะทำหน้าที่รักษาสมดุลในสมองที่ได้รับการกระตุ้น ซึ่งช่วยทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายและนอนหลับสบาย อีกทั้งยังทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อ (anterior pituitary) ซึ่งทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโต (HGH) ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ ทำให้กล้ามเนื้อเกิดการกระชับ และเกิดสารไลโปโทรปิก (lipotropic) ซึ่งเป็นสารป้องกันการสะสมไขมัน

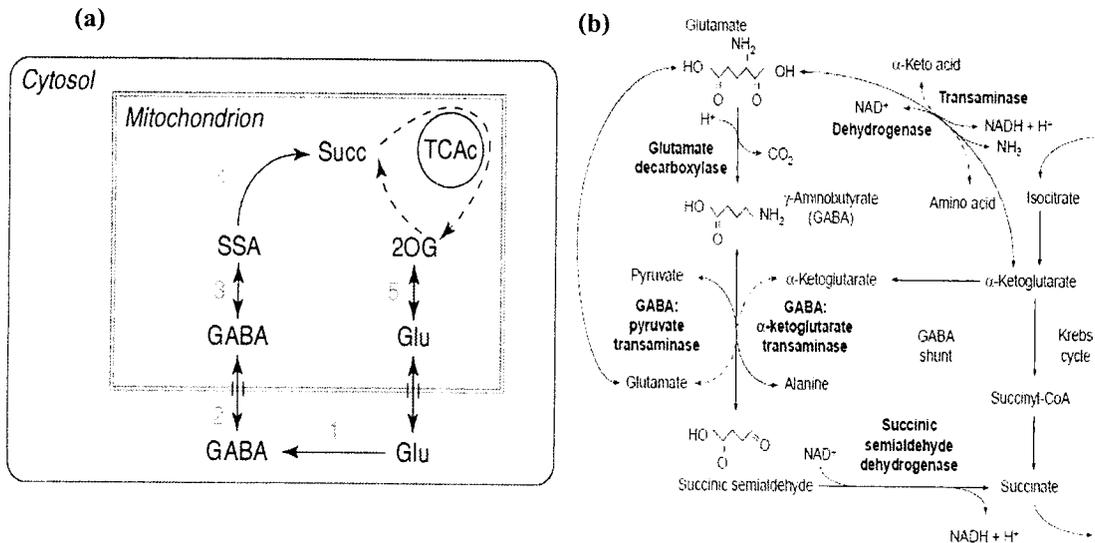
นอกจากกาบาช่วยลดอาการอัลไซเมอร์ ชะลอความเสื่อมของสมองและเซลล์แล้ว ยังมีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดมะเร็ง ในวงการแพทย์นำกาบามาใช้เพื่อการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทต่างๆ หลายโรค เช่น โรควิตกกังวล โรคนอนไม่หลับ โรคซึมเศร้า และโรคพาร์กินสัน เป็นต้น ทั้งนี้ยังมีผลการวิจัยด้านสุขภาพว่า ข้าวกล้องงอกที่ประกอบด้วยกาบามีผลช่วยลด LDL (Low-density Lipoprotein) ช่วยลดความดันโลหิต ลดน้ำหนัก ทำให้ผิวพรรณดี ตลอดจนใช้บำบัดโรคเกี่ยวกับระบบประสาทส่วนกลาง ช่วยให้เกิดความรู้สึกผ่อนคลาย ลดความตึงเครียด และทำให้ออนหลับง่าย (Ohtsubo *et al.*, 2005; Saikura *et al.*, 1994; Komatsuzaki *et al.*, 2007)

## 2.6 กระบวนการเมตาบอลิซึมของกาบา

สำหรับในพืชกาบาถูกพบครั้งแรกมานานกว่าครึ่งศตวรรษมาแล้ว วิธีการผลิตกาบาเริ่มจากกระบวนการตัดพันธะ  $-COO$  ของกรดกลูตามิก ได้คาร์บอนไดออกไซด์ (decarboxylation) และกาบา ในบริเวณของไซโทพลาสซึม จากนั้นกาบาจะเข้าไปสู่นิวโรคอนเดรีย โดยตัวนำที่เรียกว่า GABA transporter จากนั้นกาบาจะเปลี่ยนไปเป็น succinic semialdehyde (SSA) และสารตัวนี้ก็จะเปลี่ยนเป็น succinate หรือ 4-hydroxybutyrate (GHB) โดยทันที (Shelp *et al.*, 1999; Bouché and Fromm, 2004) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 (Shelp *et al.*, 1999) การเปลี่ยนแปลงตามข้างต้นนี้จะรวมไปถึงระบบประสาทของสัตว์จนถึงระบบสืบพันธุ์ของพืชดอก เช่น *Arabidopsis thaliana* (Palanivelu *et al.*, 2003)

กาบาจะเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วเมื่อมีการกระตุ้นด้วยวิธี biotic และ abiotic (Kinnersley and Turano 2000) และจะสะสมในพืชในรูปแบบของแหล่งอาหารประเภทไนโตรเจน (Kato-Noguchi and Ohashi, 2005; Fait *et al.*, 2006; Reggina *et al.*, 2000; Bouche' *et al.*, 2003a; 2003b

นอกจากนี้กระบวนการเมตาบอลิซึมยังถูกกระตุ้นด้วยแสงระหว่างกระบวนการเปลี่ยนเป็นกาบา และ ยังขึ้นกับปริมาณไนโตรเจน (Fait *et al.*, 2005; Allan and Shelp, 2006; Masclaux-Daubresse, 2002)



รูปที่ 2.7 วิธีเมตาบอลิซึมการเกิดกาบาโดยทั่วไป (a) เมตาบอลิซึมของกาบาที่เชื่อมโยงกับวิธีอื่น (b) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิธีเมตาบอลิซึมของกาบาโดยจะเน้นสีเทา (Shelp *et al.*, 1999; Bouche *et al.*, 2003a;2003b).

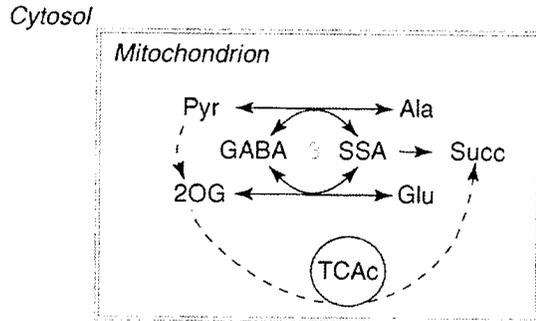
### 2.7 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของกาบา

เมตาบอลิซึมของกาบาเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ 3 ชนิด คือ กลูตาเมตทีคาร์บอกซีเลส, GABA transaminase (GABA-T) และ succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH), respectively. (รูปที่ 1.9b) (Shelp *et al.*, 1999) การทราบคุณสมบัติและเข้าใจการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะช่วยให้ควบคุมกลไกการผลิตกาบาได้ (รูปที่ 2.7)

ในไซโทพลาสซึมของพืชทั่วไป เช่น ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) จะมีการเปลี่ยนจากกลูตามิกเป็นกาบาโดยเอนไซม์กลูตาเมตทีคาร์บอกซีเลส ซึ่งถูกควบคุมโดย  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin binding domain (CaMBD), (Snedden and Fromm, 2001) การแยก calmodulin-binding domain ออกไปทำให้เปลี่ยนโครงสร้างของเอนไซม์และการเจริญของต้นยาสูบผิดปกติ (Fermie *et al.*, 2001).

เอนไซม์ GABA-T ยังสามารถใช้ pyruvate (Pyr) หรือ 2-oxoglutarate (2OG) เป็น amino acid acceptor เพื่อที่จะเปลี่ยนจาก GABA เป็น SSA (รูปที่ 2.8) ถ้าเลือกใช้ Pyr จะได้ alanine (Ala) เป็นผลิตภัณฑ์, แต่ถ้าเลือก 2OG จะได้กรดกลูตามิกแล้วจะได้กรดกลูตามิกกลับเข้าสู่ในวิถีเมตาบอ

ลิซิมเปลี่ยนเป็นกาบาอีกครั้ง(Fernie *et al.*, 2001; Geigenberger and Stitt, 1993) จึงเป็นการรักษาสมดุลปริมาณกาบาในไมโทคอนเดรียต่อปริมาณของกรดกลูตามิก ดังแสดงในรูปที่ 2.8.



รูปที่ 2.8 วิธีเมตาบอลิซึมของกาบาที่พบในไมโทคอนเดรีย (Fernie *et al.*,2001)

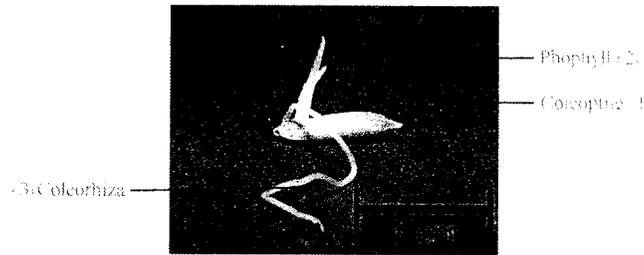
## 2.8 กระบวนการงอกของข้าว

จากการศึกษาทางกายภาพและทางชีวเคมีของเมล็ดข้าว พบว่าเมล็ดข้าวประกอบด้วย “เปลือกหุ้มเมล็ด” หรือ “เกลบ” (Hull หรือ Husk) ซึ่งจะหุ้มข้าวกล้อง

ในกระบวนการสีข้าว นั้น ส่วนที่เป็นเปลือกนอกหรือเกลบนี้อาจถูกสีทิ้งไป เหลือแต่ข้าวกล้องในเมล็ดประกอบด้วย “จมูกข้าว” หรือ “คัพพะ” (Germ หรือ Embryo) ซึ่งเป็นตัวอ่อน ถ้านำไปแช่น้ำและอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม ส่วนนี้ก็จะเจริญเติบโตไปเป็นตัวอ่อนได้

นอกจากนี้ยังมี “รำข้าว” (เยื่อหุ้มเมล็ด) และ “เมล็ดข้าวขาว” หรือ “เมล็ดข้าวสาร” (Endosperm) สารอาหารในเมล็ดข้าว นั้นประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบหลัก โดยมี โปรตีน วิตามินบี วิตามินอี และแร่ธาตุที่แยกไปอยู่ในส่วนต่างๆ ของเมล็ดข้าว นอกจากนี้ยังพบ สารอาหารประเภท ไขมันซึ่งพบได้ในรำข้าวเป็นส่วนใหญ่ สามารถนำมาสกัดเป็นน้ำมันรำข้าวที่นิยมบริโภคในครัวเรือน

กระบวนการงอกของข้าวเริ่มจากการที่ข้าวดูดซับน้ำที่อุณหภูมิที่เหมาะสมและมีออกซิเจน รวมทั้งมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในเมล็ดและเกิดการผลิสารสำคัญเพื่อเป็นอาหารให้กับตัวอ่อน ดังนั้น กระบวนการงอกจะเริ่มขึ้นจากการบวม น้ำ มีราก และใบเลี้ยงออกมา ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 การงอกของข้าว (1) coleoptiles (2) Phophyll (3) Coleorhiza ( Smith and Dilday, 2003)

อย่างไรก็ตาม ในเมล็ดที่แห้งส่วนมากจะมีรากเกิดก่อน แต่ในเมล็ดที่แช่น้ำโดยส่วนมาก ใบเลี้ยงจะออกมาก่อน ทั้งนี้่าจะเป็นเพราะพืชที่แช่น้ำมีปริมาณออกซิเจนเหลืออยู่น้อย (Takahashi et al, 1995)

ข้าวเมื่ออยู่ในสถานะที่มีการเจริญเติบโต จะมีการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยจะกระตุ้นให้เอนไซม์ภายในเมล็ดข้าวเกิดการทำงาน เมื่อเมล็ดข้าวเริ่มงอก (malting) สารอาหารที่ถูกเก็บไว้ในเมล็ดข้าวก็จะถูกย่อยสลายไปตามกระบวนการทางชีวเคมี จนเกิดเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลเล็ก (oligosaccharide) น้ำตาล (reducing sugar) และโปรตีนภายในเมล็ดข้าวก็จะถูกย่อยให้เกิดเป็นกรดอะมิโน เปปไทด์ และสร้างสารสำคัญ เช่น กาบา

ในกระบวนการงอกของข้าวสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ ดังนี้ 1: ระยะบวมน้ำ, 2: ระยะการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึม เช่น คาร์โบไฮเดรตเมตาบอลิซึม, 3: ระยะการเจริญของรากและยอด โดยที่ในระยะที่ 1 และ 3 น้ำจะถูกดูดซึมเข้าไปผ่านเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นจำนวนมาก ในขณะที่ในระยะที่ 2 จะถูกควบคุมโดยแก๊ส (ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทรีลีน), ฮอร์โมน รวมทั้งเอนไซม์ ก็จะถูกกระตุ้นมากในระยะนี้ กระบวนการที่เกิดขึ้นในระหว่างการงอกแบ่งได้ 2 กระบวนการหลักคือ

### (1) กระบวนการย่อยสลายโปรตีน

เมล็ดข้าวมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) อยู่หลายชนิด บางชนิดอยู่ในเมล็ดข้าวที่ยังไม่งอก และเอนไซม์บางชนิดอยู่ในเมล็ดข้าวที่กำลังงอก โดยเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในเมล็ดข้าวที่กำลังงอกนี้ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความจำเพาะกับสับสเตรต คือ กลุ่ม (1) endopeptidases: ซึ่งจะตัดพันธะที่อยู่ภายในสายของโปรตีนให้เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก กลุ่มที่ (2) aminopeptidases: จะตัดพันธะของเพปไทด์สายสั้นให้ได้เป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็ก กลุ่ม (3) carboxypeptidases: จะตัดพันธะของเพปไทด์สายสั้นให้ได้เป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็ก โดยเริ่มต้นจากปลาย carboxyl group นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์กลุ่มอื่นที่น่าสนใจ เช่น

hydrolyzing enzymes, ที่จะตัดพันธะของเปปไทด์เท่านั้น เช่น peptide hydrolases (Kigel and Galili, 2003)

รายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนที่สะสมในเอนโดสเปิร์มของข้าวจะถูกย่อยโดย เอนไซม์โปรตีเอส ได้เป็นโปรตีนสายสั้น กรดอะมิโน และสารประกอบจำพวกเอไมด์ (Kigel and Galili, 2003; Horikochi and Morita, 1982). ดังแสดงในตารางที่ 1.4 ดัชนีอ่อนของข้าวจะใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนเหล่านี้ เป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโต (Kigel and Galili, 2003).

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนอื่นๆ ในเมล็ดที่กำลังงอกนั้นส่วนมากจะเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน เช่น glutaminase และ asparaginase เอนไซม์จำพวกนี้จะพบในเมล็ดที่กำลังงอกและการทำงานขึ้นกับไอออนของ  $K^+$  (Sodek *et al.*, 1980). เอนไซม์เหล่านี้จะทำงานโดยเร่งการปลดปล่อย  $NH_4^+$  ออกจาก asparagines โดยเอนไซม์ asparaginase และใช้  $NH_4^+$  ทำหน้าที่สังเคราะห์กรดอะมิโนตัวอื่น

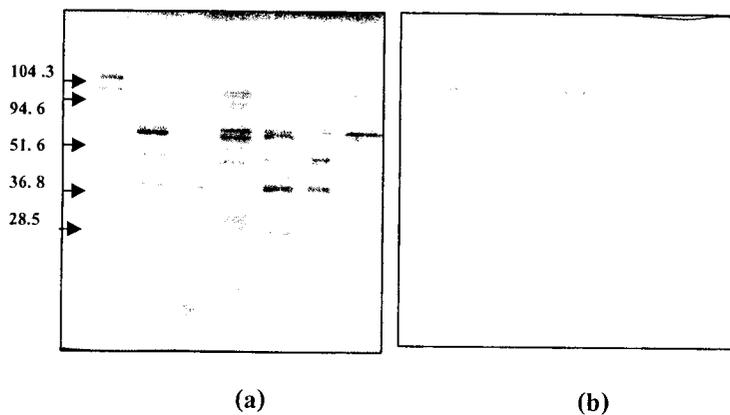
ดังนั้นในกระบวนการงอกของเมล็ดมีประโยชน์ในการที่มนุษย์จะนำมาบริโภค เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประโยชน์และมีประสิทธิภาพในการนำมาเพิ่มสารอาหารและเพิ่มมูลค่าของข้าว (Park and Oh, 2006;2007; Komatsuzaki *et al.*, 2005;2007)

ตารางที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดอะมิโนและสารประเภทเอไมด์ในระหว่างการงอก

Amino acid	Time of germination in days (mg/g)			
	0	1	2	3
Alanine	5	30	80	220
Threonine	5	20	40	190
Leucine	20	20	60	280
Serine	30	30	60	250
<b>GABA'</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>25</b>
Lysine	15	5	20	40
Tryptophan	5	5	2	-
Glutathione	10	0	0	20
Aspartic acid	40	35	35	40
Glutamic acid	60	80	110	160
Asparagine	30	40	60	240
Glutamine	60	40	360	700

นอกจากนี้ Horikoshi and Morita, (1982) ได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนโดยรวมในระหว่างการงอกของข้าว โดยใช้เทคนิค Sodium Dodecyl Sulphate-Polycrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ติดตามรูปแบบของโปรตีนได้เปลี่ยนแปลงไปจากโปรตีนในข้าวที่ไม่งอก โดยสีของแถบโปรตีนจากข้าวที่งอกเข้มน้อยกว่าข้าวที่ไม่งอก

Panatda *et al.*, (2010) ได้ค้นพบข้อมูลที่สนับสนุน Horikoshi and Morita, (1982) ว่าได้แสดงรูปแบบของโปรตีนที่สกัดจากข้าวที่ไม่งอก (รูปที่ 2. 10a) เปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดจากข้าวที่งอกที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า แถบโปรตีนเริ่มหายไปหลังจากการงอกเป็นระยะเวลา 30 วัน ดังแสดงในรูปที่ 2. 10

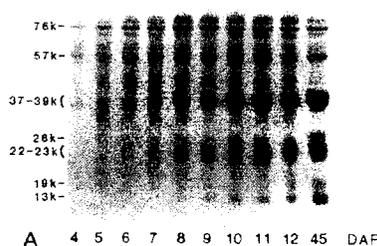


รูปที่ 2.10 รูปแบบของโปรตีนของข้าวในระหว่างการงอกโปรตีนลดลงหลังจากกระบวนการงอก (Panatda *et al.*, 2010)

จะเห็นว่าในกระบวนการงอกจะทำให้ปริมาณโปรตีนลดลง ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ถูกกระตุ้นแล้วการย่อยโปรตีนกลายเป็นกรดอะมิโน และเป็นสารตัวกลางชนิดอื่น (secondary metabolite) โปรตีนชนิดใหม่ และสารประกอบประเภทเอไมด์ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการงอก

## (2) กระบวนการสะสมของโปรตีนและเอไมด์ในระหว่างการงอก

นอกจากปริมาณโปรตีนจะลดลงในระหว่างการงอกแล้ว โปรตีนและสารประกอบอื่นสามารถสะสมได้ในระยะแรกของการงอก ดังแสดงในรูปที่ 2.11 ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นในช่วงขนาด 10-76 kd มากกว่า 15 ชนิด. หลังจากการงอกได้ 4-6 วัน, และมีการสะสมเป็นจำนวนมากที่ระยะเวลาการงอก 45 วัน (Yamagata *et al.*, 1982)



รูปที่ 2.11 การสะสมของสารประกอบไนโตรเจน เช่น โปรตีน และเอไมด์ ในแอนโดสเปิร์มระหว่างการงอกของข้าว (Yamagata *et al.*, 1982).

นอกจากนี้ในกระบวนการงอกจะมีการสะสมสารประกอบจำพวกเอไมด์ เช่น GABA,  $\gamma$ -methylene glutamic acid, beta-pyrazol-1-alanine, lathyrine และสารชนิดอื่นๆ Clibnall, (1939) ได้กล่าวว่า หลังจากที่โปรตีนถูกย่อยเป็นกรดอะมิโน จากนั้นกรดอะมิโนจะเกิดกระบวนการ oxidative deamination ทำให้เกิดสารประกอบจำพวกเอไมด์ชนิดต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช

## 2.9 เทคนิคการติดตามการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซิเลส และ GAD protein

### 2.9.1 Liquid Chromatography (HPLC)

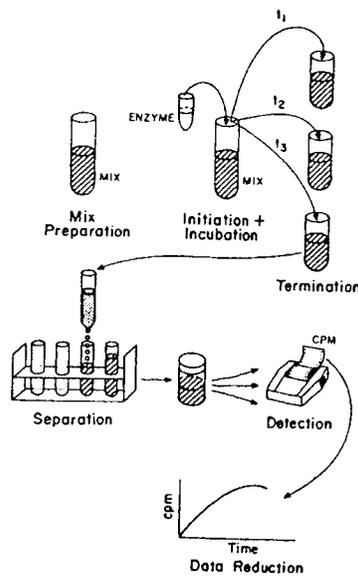
การพัฒนาการใช้ HPLC เพื่อติดตามการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซิเลส เป็นวิธีที่แม่นยำ เนื่องจากสามารถติดตามผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ชนิดนี้ได้โดยตรงชนิดเดียว แต่มีขั้นตอนการเตรียมหลายขั้นตอน ขั้นตอนแรกเริ่มจากการผสมสารตั้งต้น, บัฟเฟอร์ pH ที่เหมาะสม, cofactor (โลหะ, PLP และอื่นๆ) และเอนไซม์ เข้าด้วยกันในหลอดทดลอง และปล่อยให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า กาบามา ฌ อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ดังแสดงใน รูปที่ 2.12 ขั้นตอนสุดท้ายจะเป็นขั้นตอนหยุดปฏิกิริยา โดยจะแยกสารตั้งต้นออกจากปฏิกิริยาแต่โดยส่วนใหญ่แล้วจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากกว่าการแยกสารตั้งต้นออกไป

จากนั้นจะเป็นขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาโดยการเปิดสารผลิตภัณฑ์ในหลอดทดลองออกมา วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งการเปิดสารผลิตภัณฑ์นี้อาจจะเปิดออกมาเป็นช่วงเวลาติดต่อกันทุกๆ ช่วง หรือรอให้ปฏิกิริยาสิ้นสุดลง แล้วจะวิเคราะห์ผลที่ได้จากการฉีด HPLC ถ้ามีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นมาก ก็แสดงว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดี

ได้มีการใช้เทคนิค HPLC ในการติดตามการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซิเลส เช่น งานวิจัยของ Rossetti and Lombard, (1996) โดยการนำ เอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซิเลส มาผสมกับกรดกลูตามิกในสภาวะที่มี PLP พบว่า เกิดกาบามาที่เป็นสารผลิตภัณฑ์ จากนั้นนำกาบามาทำให้เกิดอนุพันธ์เพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ โดยการเติม phenyl-isothiocyanyl ได้เป็น (PTC-GABA) นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ตามสภาวะดังนี้คือ LiChrospher RP-18 column;

isocratic elution และใช้ mobile phase เป็น pH 5.8 acetate buffer in acetonitrile-water) ด้วย UV absorbance detection at 254 nm

งานวิจัยอื่นๆ ได้ติดตามการทำงานของเอนไซม์กลูตามาเทตีคาร์บอกซีเลสที่สกัดจากข้าวตังอก โดยใช้สภาวะในหลอดทดลองที่ประกอบด้วย sodium phosphate, pH 5.6, 100 mM L-glutamate, PLP และเติมเอนไซม์ที่สกัดได้ลงไปในช่วงตอนหลังสุด นำหลอดทดลองไปไว้ในที่ 40°C นาน 60 นาทีเพื่อปล่อยให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยา และหยุดปฏิกิริยาด้วย 32% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). นำส่วนผสมมากรอง และทำอนุพันธ์ของกาบา และวิเคราะห์ด้วย Agilent 1100 HPLC (Zhang *et al.*, 2007a; Zhang *et al.*, 2007b; 2006 )



รูปที่ 2.12 การติดตามการทำงานของเอนไซม์กลูตามาเทตีคาร์บอกซีเลส (GAD activity) โดยเทคนิค HPLC

จากรูปที่ 2.12 เมื่อผสมสารตั้งต้นและเอนไซม์เข้าด้วยกันปฏิกิริยาจึงเริ่มต้นขึ้น ในระหว่างการเร่งปฏิกิริยา สารผลิตภัณฑ์จะถูกนำออกมาวิเคราะห์ด้วยการฉีด HPLC ทันที ที่เวลา  $t_1$ ,  $t_2$  and  $t_3$  จนกระทั่งปฏิกิริยาสิ้นสุดลง วิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่ได้แล้วคำนวณหาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หน่วยเป็น ยูนิต (Unit)

1 ยูนิตของเอนไซม์กลูตามาเทตีคาร์บอกซีเลส หมายถึง การเกิด 1  $\mu\text{mol}$  ของ GABA ภายใน 30 นาทีที่ 40°C

วิธีดังกล่าวนี้เป็นวิธีที่ sensitive, reproducible และ specific แต่ การวิเคราะห์ตัวอย่างหลังจากปีเปิดออกจากหลอดทดลองแล้วจะต้องเปิดเครื่อง HPLC รอไว้ และฉีดทันทีจะไม่ทิ้งสารตัวอย่างค้างคืน

### 2.9.2 Western blotting analysis

เทคนิค Western blotting หรือ Immunoblotting ใช้ในการติดตามโปรตีนที่ยึดติดอยู่บนเมมเบรน ดังนั้นแอนติบอดีเป็นสารประเภทโปรตีนจึงสามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ได้ โดยการใช้ monoclonal หรือ polyclonal antibody ที่จับจำเพาะกับโปรตีนที่สนใจ เป็นวิธีที่สามารถใช้ติดตามโปรตีนที่ผสมอยู่กับโปรตีนชนิดอื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยอาศัยหลักการของขนาดโมเลกุล ประจุ และค่า pI เป็นต้น

ขั้นตอนจะเริ่มจากการตรึงโปรตีนที่สนใจลงบนเมมเบรน โดยจะแยกโปรตีนลงบน SDS-PAGE ก่อน แล้วค่อยถ่ายลงเมมเบรน ซึ่งถ้าจะกล่าวโดยสรุปแล้ว เทคนิค western blotting สามารถแบ่งได้ 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

#### (1) การถ่ายโปรตีนที่อยู่บนเจล (SDS-PAGE) ลงสู่เมมเบรน

โปรตีนที่จะถ่ายลงสู่เมมเบรนนั้น จะนิยมใช้เมมเบรนอยู่ 2 ชนิด คือ

- ไนโตรเซลลูโลส; ไนโตรเซลลูโลสเป็นที่นิยมใช้ เพราะ ราคาไม่แพงและสามารถช่วยป้องกันการจับกันที่ไม่จำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับโปรตีนที่สนใจ
- ไนลอน; ไนลอนมีความจำเพาะและจับกับโปรตีนได้สูงมาก โดยเฉพาะ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่มากหรือโปรตีนที่แสดงสมบัติเป็นกรด และไนลอนนี้จะทนต่อภาวะ mechanical stress แต่มีข้อจำกัดที่ราคาแพงมากกว่าไนโตรเซลลูโลส

เทคนิคที่ใช้ในการถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน มี 2 แบบ คือ

- Semi-dry blotting, วิธีนี้จะซึบเมมเบรนไว้กับเจลที่มีโปรตีนติดอยู่มีลักษณะการประกอบคล้ายแซนวิช ที่ชุ่มไปด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไป ประมาณ 10-30 นาที โปรตีนก็จะย้ายจากเจลลงสู่เมมเบรน ที่เสมือนเป็นขนมปังประกบอยู่ด้านล่าง ดังแสดงในรูป
- Wet tank blotting, นำเจลมาประกบกันแบบแซนวิชแล้วนำไปแช่ในแทงค์ของสารละลายบัฟเฟอร์ แต่จะใช้เวลานานประมาณ 45 นาที หรือประมาณ 1 คืน

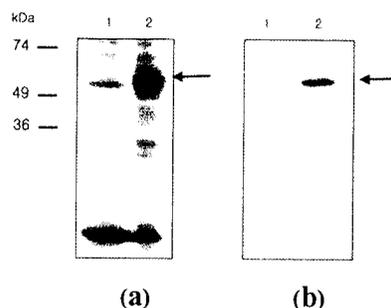
## (2) การติดตามโปรตีนที่สนใจโดยการจับจำเพาะด้วยแอนติบอดี

การติดตามโปรตีนที่ยึดอยู่กับแผ่นเมมเบรนจะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนโดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนย่อยดังนี้;

- นำแผ่นเมมเบรนไปติดฉลากด้วยแอนติบอดีตัวแรก แอนติบอดีจะเข้าจับกับโปรตีนจำเพาะกับแอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นให้จับพอดีได้กับโปรตีนที่สนใจ ซึ่งจะใช้เวลาหลายชั่วโมงถึง 1 คืน
- จากนั้นนำแอนติบอดีตัวที่สองที่จับพอดีกับแอนติบอดีตัวแรก โดยทั่วไปจะสกัดมาจากกระด้างที่ติดฉลากไว้กับเอนไซม์ horseradish peroxidases แล้วจะสามารถมองเห็นแถบของโปรตีนที่ตรวจวัดเจอ จากการที่เอนไซม์ที่ติดอยู่กับแอนติบอดีตัวที่ 2 เข้าทำปฏิกิริยา

มีงานวิจัยที่ผ่านมาของ Yun and Oh, (1998) ที่ใช้เทคนิค western blotting ในการตรวจหาเอนไซม์กลูตามาเทตีคาร์บอกซีเลส ที่สกัดจาก *E.coli* ที่ได้รับยีนที่ผลิตเอนไซม์กลูตามาเทตีคาร์บอกซีเลส จะพบว่า เอนไซม์ชนิดนี้มีขนาดประมาณ 56-58 kd (รูปที่ 2.13), ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าที่สกัดได้จาก *E. coli* ที่มีขนาด 53 kd จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์กลูตามาเทตีคาร์บอกซีเลสในข้าวสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยใช้เทคนิค western blotting

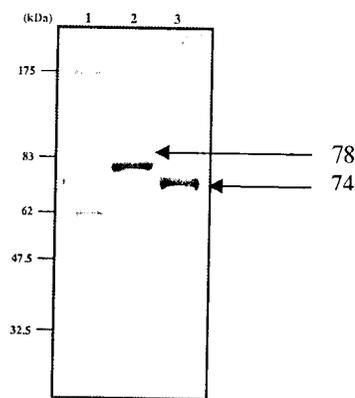
ขณะที่ Akama และ Takaiwa, (2007) ได้ใช้เทคนิค western blotting มาติดตามเอนไซม์กลูตามาเทตีคาร์บอกซีเลส ที่สกัดจาก *E.Coli* ที่ได้รับการถ่ายยีนมาจากข้าว เช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น หลังจากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย nickel-affinity chromatography และ anion-exchange chromatography พบว่ามีขนาด 78 kd และ 74 kd สำหรับไอโซไซม์ OsGAD1 และ OsGAD2, ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1.18. โดยที่เลน 1 และ 2 แทน protein size marker standard และ wild-type OsGAD2 ซึ่งขาด Ca-calmodulin ที่ปลาย C-terminal



รูปที่ 2.13 แผ่นเจลของ SDS-PAGE และ แผ่นเมมเบรน Western-blot analyses of RiceGAD-encoded protein expression (Yun and Oh, 1998). (a) แผ่นเจลที่ประกอบด้วย lanes 1 คือ เอนไซม์ที่สกัดจาก *E. coli* ซึ่งได้รับเวกเตอร์ pVUCH-RiceGAD and 2, เอนไซม์ที่สกัดจาก *E. coli* ซึ่งได้รับ

เวกเตอร์ pVUCH-RiceGAD หลังกระตุ้นด้วย IPTG, ตามลำดับ (b) แผ่นเมมเบรนที่ตรวจพบเอนไซม์กลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลท ที่ใช้ anti-GAD monoclonal antibody มาจับจำเพาะ

บริเวณที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่พบเอนไซม์ จะมีลักษณะเป็นแถบสีดำเนื่องจากการเรืองแสงขนาด 56-58 kd ถ้ามีความเข้มข้นมาก ก็แสดงว่ามีปริมาณเอนไซม์ที่แสดงออกมาปริมาณมาก เมื่อถ่ายยีนที่แสดงออกสำหรับกลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลทในข้าวไปสู่ *E. coli* BL21 แล้วตรวจสอบว่าใน *E. coli* BL21 ได้รับยีนดังกล่าวหรือไม่ โดยการตรวจสอบโปรตีนกลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลท ลูกศรชี้ตำแหน่งที่พบเอนไซม์ จะมีลักษณะเป็นแถบสีดำเนื่องจากการเรืองแสงขนาด 74 และ 78 kd (Akama and Takaiwa, 2007)



**รูปที่ 2.14** แสดงตำแหน่งที่พบเอนไซม์กลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลท จะมีลักษณะเป็นแถบสีดำเนื่องจากการเรืองแสงขนาด 74 และ 78 kd (Akama and Takaiwa, 2007)

เทคนิคอื่น ๆ ที่ใช้ในการติดตามการทำงานของเอนไซม์กลูตามาเทดีคาร์บอกซีเลทเอนไซม์แสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 เทคนิคอื่นๆที่ใช้ในการติดตามการทำงานของเอนไซม์กลูตามาเทคิคาร์บอกซีเลสในไซม์

ผู้แต่ง	เครื่องมือที่ใช้	วิธีการ	การคำนวณ	ข้อดี/ข้อเสีย
Rossetti and Lombard, 1996 Rossomando, 1998 Zhang et al., 2007a, 2007b, 2006	HPLC	The reaction consisted of sodium phosphate, pH 5.6, L-glu, PLP, and enzyme. Incubate at 40°C for 60 min, and then terminated by 32% (w/v) TCA. Analysis for GABA content by HPLC	1 $\mu$ mol of GABA produced from L-glu per 30 min at 40°	Time-consuming High accuracy
Holdiness et al., 1981	GC/GC-MS	Derivatived volatile was trapped and directly injected to GC/GC-MS port	1 $\mu$ mol of GABA produced from L-glu per 30 min at 40°C.	Time-consuming High accuracy
Yang et al., 2006	pH indicator	Qualitative analysis by the complex pH indicator (methyl red and methylene blue dissolved in methanol, pH 5.4 was added to the sample, and the color change was observed.	-	Rapid and Low cost Many sample can be applied
Spink et al., 1985 Satyanarayan and Madhusudanan, 1985	Radiometric	Predicated on L-[ <sup>14</sup> C]Glu-dependent <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> production. The reaction medium consisting of main components such as, sodium hydroxide or potassium hydroxide, buffer, enzyme, cofactor (PLP), L-[ <sup>14</sup> C] glutamic acid in sealed side arm flask containing <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> trap.	One unit of GAD activity is defined as 1 $\mu$ mol of CO <sub>2</sub> evolved per min at 37 °C	Should be together performed with the other techniques Harmful radiometric chemical
Strigáčová et al., 2001	Radiometric	Assayed for the product <sup>14</sup> C-GABA by using U- <sup>14</sup> C-glutamic acid	One unit of GAD activity is defined as 1 $\mu$ mol of CO <sub>2</sub> evolved per min at 37 °C	
Cozzani et al., 1970	Warburg manometric	Measurements chamber contained buffered substrate solution; after thermal equilibration at optimal time, enzyme solution was tipped in from the side arm. Gas evolution continued at an essentially linear rate for several minutes	One unit was defined $\mu$ l of CO <sub>2</sub> evolved in 10 min.	Contaminated non-specify CO <sub>2</sub> Traditional method
Manchenko, 1996	Native gel	Incubate the native gel contains activated GAD enzyme in colored substrate solution	-	High cost of reagents using for color emission

## 2.10 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของ GAD เอนไซม์เริ่มต้นขึ้นตั้งแต่ปี 1994 โดย Beutista ซึ่งพบว่า การทำงานและความหลากหลายของ GAD เอนไซม์ จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของข้าว ต่อมาในปี 1994, Saikura พบว่า เมื่อนำเมล็ดข้าวมาแช่ในน้ำภายใต้สภาวะที่เป็นกรด จะทำให้ปริมาณกาบาในเมล็ดข้าวเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า GAD เอนไซม์ ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด จากการค้นพบครั้งนี้ ทำให้มีงานวิจัยที่พยายามหาวิธีที่มีประสิทธิภาพและง่ายมาเพิ่มปริมาณกาบาในข้าวโดยวิธีการแช่เมล็ดข้าวเพื่อทำให้งอกเป็นจำนวนมาก (Ohtsubo *et al.*, 2005; Saikura *et al.*, 1994; Komatsuzaki *et al.*, 2007) เพื่อจะพัฒนาให้ข้าวเป็นอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ

Zhang *et al.*, 2006 และคณะ ได้เติมต้นอ่อนของข้าว (rice germ) เพื่อเป็นแหล่งของ GAD เอนไซม์ ลงไปในปฏิกิริยาที่มีกลูตามิกเป็นสารตั้งต้น ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 5.6 แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 40 °C พบว่า ปริมาณกาบาเพิ่มมากถึง 2.26 กรัม ต่อปริมาณ rice germ ที่ใช้เป็นแหล่งของ GAD เอนไซม์ 100 g

Zhang *et al.*, 2007 และคณะ ได้สกัดแยก GAD จาก rice germ และศึกษาลักษณะเฉพาะพบว่า เป็นเอนไซม์ที่มีขนาด 78 kDa ที่มี 2 subunit แต่สามารถมองเห็นเอนไซม์ชนิดนี้แค่ 1 subunit ขนาด 40 kDa ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีขนาดของ subunit เท่ากัน เลยเกิดการซ้อนทับกัน ทำให้เราเห็นแค่ตำแหน่งเดียว แต่ในขณะที่ Akama and Takaiwa, 2007 พบว่า เอนไซม์ที่มีขนาด 76 kDa ซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกัน ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5-5.8 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 40 °C. ค่า Km สำหรับการใส่ glutamic acid and PLP เท่ากับ 32.3 mM และ 1.7 mM, ตามลำดับ. ส่วนสารเคมีที่ใช้เติมลงไปในการเร่งด้วยเอนไซม์ชนิดนี้พบว่า HgCl<sub>2</sub>, KI และ AgNO<sub>3</sub> ทำให้ความสามารถของเอนไซม์ลดลงถึง 68.5%, 44.9% and 32.4%, ตามลำดับ, แต่ในขณะที่ CaCl<sub>2</sub> ทำให้การทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 145%

อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้เพื่อความเข้าใจเกี่ยวกับ GAD เอนไซม์ มากขึ้น Akama and Takaiwa, (2007) ได้สกัดและแยก cDNA จากข้าวที่เป็นยีนที่ใช้สำหรับการถอดรหัสออกมาเป็น GAD เอนไซม์ พบว่าแท้จริงแล้ว cDNA ที่ code สำหรับ GAD เอนไซม์ มี 2 รูปแบบ เรียกว่า ไอโซฟอร์ม ซึ่งหมายความว่า GAD เอนไซม์มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน 2 แบบ แต่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนจาก กลูตามิกเป็นกาบา ได้เหมือนกัน โดยตั้งชื่อว่า OSGAD1 และ OSGAD 2 ซึ่งทั้งสองรูปแบบนี้มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน และแตกต่างกันตรงที่การมี calcium calmodulin มาเกาะที่ปลาย

C- terminal ของสายเอนไซม์ โดยที่ OSGAD1 จะมี calcium calmodulin มาเกาะอยู่ แต่ OSGAD2 ไม่มี calcium calmodulin ที่ปลาย C- terminal

ความสำคัญของการมี calcium calmodulin มาเกาะอยู่ที่ปลาย C- terminal นี้จะเชื่อมโยงไปสู่การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ ถ้าเอนไซม์อยู่รูปแบบ OSGAD1 นั้น เวลาที่ต้องการใช้เอนไซม์ชนิดนี้เร่งปฏิกิริยาการเกิดกาบา จะต้องเติม Calcium chloride ลงไปด้วย เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น เป็นต้น ดังนั้น รูปแบบไอโซฟอร์มของเอนไซม์ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะใช้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ นอกเหนือไปจากการศึกษา อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน เป็นต้น

Oh และ Choi., 2000 พบว่า ปริมาณกาบาจะเพิ่มมากที่สุดเท่ากับ 2,011 nmol ต่อน้ำหนักสด เมื่อแช่ข้าวในสารละลายไคโตซานและกรดกลูตามิก ซึ่งมีปริมาณมากกว่าวิธีที่แช่ข้าวในน้ำ 13 เท่า

แต่อย่างไรก็ตามกาบาที่ผลิตได้จากงานวิจัยที่ผ่านมา ส่วนใหญ่จะใช้กรดกลูตามิกที่อยู่ในเซลล์ของพืชเอง ซึ่งกลูตามิกที่อยู่ในเซลล์พืชจะมีปริมาณอยู่น้อยมาก ดังนั้น Ohtsubo, *et al.*, 2000 ได้พัฒนาวิธีการเพื่อผลิตกาบาให้มีปริมาณสูงโดยการเติมกรดกลูตามิกจากภายนอกลงไป พบว่า ปริมาณกาบาเพิ่มขึ้นถึง 29.0 g/100 g แต่งานวิจัยนี้มีข้อเสียตรงที่จะต้องเติมกรดกลูตามิกลงไปปริมาณมากทำให้ต้นทุนการผลิตสูง

Komatsuzaki, *et al.*, 2007 ได้เลือกใช้เมล็ดข้าวที่มี germ ขนาดใหญ่ แล้วนำมาแช่และเติมแก๊สลงไป โดยการแช่จะใช้เวลา 3 ชั่วโมงและผ่านแก๊สเป็นเวลานาน 21 ชั่วโมง ที่ 35 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณกาบาในข้าวที่งอกเท่ากับ 24.9 mg/100 mg ซึ่งมากกว่าวิธีเดิมที่พบว่ามีปริมาณกาบาเท่ากับ 10.1 mg/100 g

## 2.11 สถานการณ์ข้าวกล้องงอกในประเทศไทยและต่างประเทศ

สำหรับแนวทางการวิจัยและพัฒนาข้าวกล้องงอกในประเทศไทยนั้น สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ในสังกัดมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ร่วมกับศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์การเกษตรนานาชาติ ประเทศญี่ปุ่นประสบความสำเร็จในการพัฒนาข้าวกล้องงอก จากผลการวิจัยได้ทำการศึกษาหาพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมและสภาพการผลิตข้าวกล้องงอกที่มีประสิทธิภาพ พบว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อนำมาเพาะเป็นข้าวกล้องงอกสาร GABA มากที่สุด (15.2-19.5 mg/100 g) ซึ่งมีมากกว่าข้าวกล้องปกติถึง 15 เท่า GABA นี้สามารถป้องกันการทำลายสมองจากสารเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ (Beta-amyloid peptide) ที่เป็นสาเหตุของโรคสมองเสื่อมความจำ (อัลไซเมอร์)

ในประเทศไทยข้าวกล้องงอก GABA ได้มีการวางจำหน่ายเชิงพาณิชย์ ในราคาประมาณ 90 บาท ต่อ 450 กรัม หรือประมาณ 200 บาทต่อกิโลกรัม มีจำหน่ายในห้าง ร้านค้าทั่วไป และศูนย์ศิลปาชีพทุกสาขา นอกจากนี้ยังได้เน้นผลิตส่งออกไปยังต่างประเทศแล้ว อาทิ ญี่ปุ่น เกาหลี สิงคโปร์ มาเลเซีย ฮองกง ฯลฯ ผู้ประกอบการก็ยังมีโครงการที่จะนำกาไปแปรรูปเป็นสารอาหารสำเร็จรูปประเภทอื่นๆ ต่อไป เช่น นำข้าวกล้องงอกเพื่อเป็นเครื่องดื่มสุขภาพ ไอศกรีมน้ำข้าวกล้องงอก อาหารว่าง ขนมขบเคี้ยว และซูป เป็นต้น

ในตลาดต่างประเทศนั้น เช่น ประเทศญี่ปุ่นและเกาหลี ข้าวกล้องงอกเป็นผลิตภัณฑ์กำลังที่นิยม เช่น บริษัท แฟนเค็น จำกัด (FANCL) เป็นบริษัทผู้ผลิตข้าวกล้องงอกและผลิตภัณฑ์อาหารเสริมรายของญี่ปุ่น โดยก่อตั้งมาตั้งแต่ปี พ.ศ.2542 ปัจจุบันมีโรงงานผลิตข้าวกล้องงอก 2 แห่ง คือ ที่จังหวัด นากาโน และ จังหวัดนาวากานา นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาน้ำข้าวกล้องงอก ให้เป็นอาหารสุขภาพชนิดอื่นๆ มุ่งเน้นการรักษาคุณค่าทางโภชนาการจากข้าวกล้องงอก และเพิ่มทางเลือกให้ผู้บริโภคด้วย เช่น ช็อคโกแลต ไอศกรีมจากน้ำข้าวกล้องงอก และขนมขบเคี้ยวต่างๆ เป็นต้น

บริษัทนี้มีขั้นตอนการผลิตข้าวกล้องงอกที่ควบคุมคุณภาพเป็นอย่างดีโดยหลังจากรับข้าวกล้องเข้าสู่โรงงานแล้ว จะผ่านกระบวนการตรวจสอบคุณภาพขั้นต้นด้วยตาเปล่าก่อน แล้วพักไว้ 2 วัน เพื่อให้เมล็ดข้าวมีความคงตัว จึงเข้าสู่กระบวนการทำให้งอก

เริ่มจากคัดแยกวัตถุดิบเอาสิ่งปลอมปน เช่น กรวด หิน ทราย และเมล็ดแตกหักออกด้วยเครื่องตรวจวัดแบบซีซีดี (CCD sensor) ซึ่งเป็นกล้องที่ใช้ตรวจจับความผิดปกติของเมล็ดข้าวที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์

ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการคัดแยกสีด้วยเครื่องแยกสี (color sorter) เพื่อแยกเอาเมล็ดที่มีสีผิดปกติออก ข้าวจะถูกทำให้งอกโดยเฉพาะในถังทรงกระบอกใหญ่ความสูงประมาณ 15 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 เมตร จำนวนหลายถัง ถึงเหล่านี้มีการควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณน้ำให้เหมาะสมต่อการงอกอยู่ตลอดเวลา

หลังจากทิ้งให้งอกประมาณหนึ่งคืน ข้าวกล้องงอกที่ได้จะถูกทำให้แห้ง ขั้นตอนนี้มีการตรวจตรวจสอบการงอกของข้าวโดยการวัดกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ในเมล็ดข้าว รวมทั้งตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดข้าวงอกเพื่อคัดเมล็ดที่แตกหักเสียหายด้วยตะแกรงร่อน คัดแยกเมล็ดที่งอกไม่สมบูรณ์และเมล็ดที่มีสีผิดปกติออก จากนั้นจึงเข้าสู่การบรรจุลงถุงพลาสติกปิดผนึกด้วยเครื่องจักร ในห้องสะอาดปลอดเชื้อ (clean room) ก่อนนำออกวางจำหน่ายในท้องตลาดต่อไป

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทที่ผลิต
Acylamide	71.08	GE healthcare, USA
Ammonium persulphate (APS)	228.20	Biorad, USA
Anti- GAD antibody	-	Amersham, UK
Acetonitrile	41.05	LAB-SCAN, Ireland
Boric acid	61.84	CARLO, ERBA, France
Blocking agent ECL TM membrane blocking agentkit	-	GE healthcare, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	826.0	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue G-250 solution kit	854.0	Biorad, USA
Di-sodium hydrogen phosphate-di-hydrate	177.19	Scharlau, Spain
Dithiothreitol (DTT)	154.25	Biorad, USA Ethanol
2[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny]		
Ethane sulfonic acid (HEPES )	238.3	Biorad, USA
Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt (Na <sub>2</sub> -EDTA)	372.44	Sigma, USA
Ethane sulfonic acid (HEPES buffer)	238.3	Biorad, USA

สารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทที่ผลิต
Extra Thick blot paper mini blot size 7×8.4 cm		GE healthcare, USA
ECL plus western blotting-detection containing kit;		GE healthcare, USA
Limigen TM PS-3 detection reagent solution A		Amersham, UK
Limigen TM PS-3 detection reagent solution B		Amersham, UK
Formic acid	46.03	Fisher, England
Gamma-aminobutyric acid	103.12	Fluka, China
Glutamic acid (FCC, food grade)	147.13	Sigma-Aldrich, UK
Hydroxy-naphthaldehyde (HN)	172.18	Aldrich, Germany
Hybond TM-P Membrane optimized for protein transfer		Amersham, UK
Horseradish peroxidase linked whole antibody kit		Amersham, UK
Leupeptin	463.01	Amersham, UK
Magnesium choride	95.21	Fluka, China
Methanol	32.04	MERCK, Germany
2-Mercaptoethanol	78.13	Fluka, China
Methanol	32.04	MERCK, Germany
<i>N,N'</i> methylene bis acylamide	157.14	Fluka, China
<i>N,N,N',N'</i> - Tetramethylethylenediamine - (TEMED)	116.20	Fluka, China
Pyridoxyl 5' phosphate (PLP)	265.16	Fluka, Switzerland
Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)	2500	Fluka, China
Potassium hydroxide	56.10	Fluka, China
Phenyl methane sulphonyl fluoride	174.19	Fluka, China
Sodium citrate	294.10	MERCK, Germany
Sodium tetraborate	381.37	MERCK, Germany
Sodium dihydrogen phosphate- di-hydrate	156.01	Fluka, Switzerland
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	288.38	Fluka, China
Tris (hydroxymethyl) aminomethane- (Tris-HCl)	121.14	Fluka, China

### 3.3 วิธีทดลอง

#### 3.3.1 การงอก

นำข้าวมาแช่ในน้ำกลั่น 72 ชั่วโมง และเปลี่ยนน้ำทุกๆ 24 ชั่วโมง นำมาวางบนกระดาษชำระที่เปียกน้ำในกล่องพลาสติกที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งข้าวงอก (Komatsuzaki *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2007)

#### 3.3.2 การสกัดกาบา

นำข้าวกล้องงอก 250 mg ที่มีระยะเวลางอกที่แตกต่างกันมาบด แล้วเติม 800  $\mu$ l ของ 70% เอทานอล สกัดโดยใช้เครื่องเขย่า นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6000×rpm นาน 10 นาที เก็บเฉพาะสารละลายส่วนใสส่วนบน แล้วสกัดซ้ำตะกอนส่วนที่เหลือด้วยเอทานอลเมื่อครบสามครั้งแล้วนำสารละลายส่วนใสมารวมกัน (Baum *et al.*, 1996; Oh and Choi 2001; Komatsuzaki *et al.*, 2007) ทำปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ของกาบาคด้วย 2-hydroxynaphthaldehyde (HN) กรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45  $\mu$ m แล้ววิเคราะห์ปริมาณกาบาที่พบโดยใช้เทคนิค HPLC derivatization.

#### 3.3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

##### 3.3.3.1 การสกัดเอนไซม์

นำข้าวที่งอกมาบด 0.5 g โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นตัดข้าวที่บดแล้วลงใน eppendorf แล้วเติม 2 ml ของสารละลาย extraction buffer ที่เย็นจัด (ประกอบด้วย 0.2 mM PLP, 2 mM 2-mercaptoethanol (ME), 2 mM Na-EDTA, and 1 mM PMSF). นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 6000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จะได้สารละลายส่วนใสด้านบนที่แยกตัวออกมาจากตะกอน เรียกว่า สารสกัดเอนไซม์อย่างหยาบ (crude extract)

##### 3.3.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กฏตามเทคีคาร์บอกซีเลส

###### (1) ค่า pH ที่เหมาะสม

ในงานวิจัยนี้จะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด เพื่อปรับค่าความเป็นกรดเบสในระหว่างที่เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนกรดกลูตามิกเป็นกาบา คือ 0.2 M citrate buffer pH 4, 5 และ 0.2 M sodium phosphate buffer of pH 6, 7, 8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ GAD

จะเริ่มจากผสมเอนไซม์ที่สกัดได้ในขั้นตอนที่ผ่านมา กับสารละลายบัฟเฟอร์ ดังแสดงในตารางที่ 3.1. จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เพื่อให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยา หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย HN และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ค่า pH ที่เหมาะสมจะวัดจากปฏิกิริยาที่ให้ปริมาณสารกาบามากที่สุด โดยจะวัดความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา (activity) ในหน่วยของยูนิท

1 ยูนิท เท่ากับ ปริมาณของกาบาที่ผลิตได้จากปฏิกิริยา 1  $\mu\text{mol}$  ต่อเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 40°C

ตารางที่ 3.1 สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ที่แตกต่างกันเพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์

สารละลาย	หลอดที่											
	1		2		3		4		5		6	
	1	1c	2	2c	3	3c	4	4c	5	5c	6	6c
Crude enzyme ( $\mu\text{l}$ )	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
100 mM L-glu ( $\mu\text{l}$ )	200	-	200	-	200	-	200	-	200	-	200	-
0.2 mM PLP ( $\mu\text{l}$ )	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Citrate buffer pH 4	300	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate buffer pH 5	-	-	300	500	-	-	-	-	-	-	-	-
0.2 M Phosphate buffer pH 6 ( $\mu\text{l}$ )	-	-	-	-	-	-	300	500	-	-	-	-
0.2 M Phosphate buffer pH 7 ( $\mu\text{l}$ )	-	-	-	-	-	-	-	-	300	500	-	-
0.2 M Phosphate buffer pH 8 ( $\mu\text{l}$ )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	300	500

## (2) ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

ศึกษาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับเร่งปฏิกิริยาโดยเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์ และคงที่ที่ pH 6 ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันภายใต้สภาวะที่สับสเตรทคงที่และค่า pH เท่ากับ 6

สารละลาย	หลอดที่									
	1		2		3		4		5	
	1	1c	2	2c	3	3c	4	4c	5	5c
Crude enzyme ( $\mu$ l )	100	100	300	300	500	500	700	700	1000	1000
100 mM L-glu ( $\mu$ l )	300	-	300	-	300	-	300	-	300	-
0.2 mM PLP ( $\mu$ l )	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.2 M Phosphate buffer pH 6 ( $\mu$ l )	1000	1300	800	1100	600	900	500	700	100	400

c = control tube ไม่ได้เติมสับสเตรท

### (3) การหาความเข้มข้นของสับสเตรทและเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

นำ crude enzyme 1000  $\mu$ l มาเติม L-glutamic ที่ใช้เป็นสับสเตรทที่ความเข้มข้นที่ต่างกันที่ค่า pH 6 และเติม PLP เป็น cofactor ของปฏิกิริยานี้ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 นำไปเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่ 40°C จากนั้นให้เวลาทำปฏิกิริยาที่ต่างกันที่ 0, 10, 20, 30, 40 และ 60 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ มาวิเคราะห์ด้วย HPLC เปรียบเทียบปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยา

ตารางที่ 3.3 ปริมาณสับสเตรทที่แตกต่างกันในปฏิกิริยาที่เร่งด้วยปริมาณ GAD เอนไซม์คงที่

สารละลาย	หลอดที่									
	1		2		3		4		5	
	1	1c	2	2c	3	3c	4	4c	5	5c
Crude enzyme ( $\mu$ l )	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
100 mM L-glu ( $\mu$ l )	100	-	300	-	700	-	900	-	1000	-
0.2 mM PLP ( $\mu$ l )	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.2M Phosphate buffer pH 6 ( $\mu$ l )	1100	1200	900	1200	500	1200	300	1200	200	1200

### 3.3.3.3 การหากิจกรรมของ GAD เอนไซม์ในข้าวที่งอก

หลังจากที่ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ตามหัวข้อที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว จะได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้; 200  $\mu$ l ของ 0.2M sodium phosphate, pH 6, 300  $\mu$ l ของ 100 mM L-glu, 100  $\mu$ l ของ 0.2 mM PLP, และ 1000  $\mu$ l ของ crude enzyme extract ผสมส่วนผสมทั้งหมดที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อเร่งปฏิกิริยาที่ 40°C นาน 40 นาที, และนำไปหยุดปฏิกิริยา แล้วเปิดสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกาบาที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการเร่งด้วยเอนไซม์

### 3.3.4 การหาปริมาณกาบา

#### 3.3.4.1 การวิเคราะห์กาบาคด้วย HPLC

เตรียมกราฟมาตรฐานกาบาโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานกาบาที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังนี้ 125, 50, 25, 10 และ 5 ppm เปิดสารละลายที่ได้จากการทำปฏิกิริยา 1 ml จากนั้นเติมสารละลาย 0.5 ml ของ borax buffer pH 8 และ 0.5 ml of HN (0.3%w/v in methanol) นำสารละลายทั้งหมดไปอุ่นที่ water bath ที่อุณหภูมิ 80°C นาน 10 นาที ทิ้งไว้จนกระทั่งเย็น กรองด้วยไนลอนรูพรุนขนาด 0.45 micron นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทันที ตามสภาวะดังนี้ (Panatda et al, 2010 และ Khuhawar and Rajper, 2003).

C-18 Column ; particle size 0.5 ไมครอน

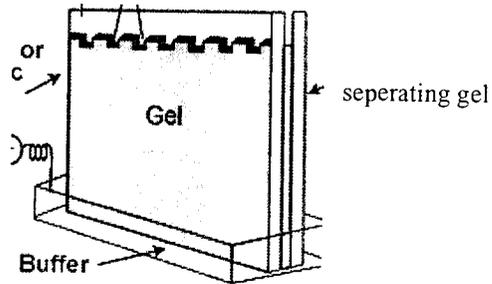
อัตราการไหล (flow rate) 1 ml/min

อัตราส่วนของ mobile phase, 70% acetonitrile: 30% ของ 0.1% formic acid



### 3.3.5.3 การแยกโปรตีนโดยใช้เทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis

ประกอบเครื่อง gel electrophoresis ขนาดกระจก (7×7 cm) จากนั้นเติม 10% separating gel ลงไปในช่องของกระจกสูงประมาณ 1.5 cm และห่างจากขอบด้านบนประมาณ 0.5 cm โดยส่วนผสมของ separating gel แสดงในตารางที่ 3.5 ค่อยๆ เติมน้ำ 100  $\mu$ l ลงบนผิวหน้าของเจลเพื่อรักษาให้ผิวหน้าเจลเรียบ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ รินน้ำออก



รูปที่ 3.1 เครื่อง gel electrophoresis

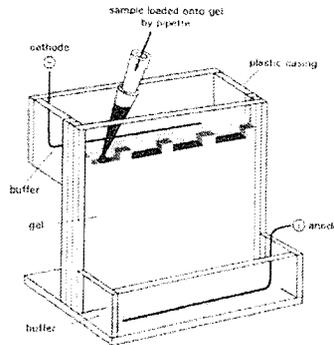
หลังจากที่ 10% separating gel แข็งตัวแล้ว จากนั้นจะค่อยๆ ใช้ dropper เติม 10% stacking gel ที่เตรียมไว้ลงไปให้ถึงขีดของกระจก จากนั้นเสียบหัวลงไปเพื่อให้เกิดช่องสำหรับใส่สารตัวอย่าง (ระวังฟองอากาศ) ปล่อยให้ stacking gel แข็งตัวนาน 30 นาที หลังจาก stacking gel แข็งตัวแล้ว ค่อยๆ ดึงหัวออก นำเจลไปวางใน electrophoresis chamber และเติม running buffer ลงไปที่ทั้งที่เป็นส่วนด้านในและด้านนอกของถังบัฟเฟอร์

ตารางที่ 3.5 ส่วนผสมที่ใช้เตรียม 10% separating gel และ stacking gel solution

สารเคมี	Separating gel ( $\mu$ l)	Stacking gel ( $\mu$ l)
30% acrylamide-bis	2500	0.325
acrylamide	-	-
4X Tris-Cl pH 6.8	1875	0.625
4X Tris-Cl pH 8.8	3125	-
Steriled water	10	1.525
TEMED	10	5
10% APS	50	25

### 3.3.5.4 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนและการใส่ sample ลงในช่องที่เตรียมไว้

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยการนำไปผสมกับ loading buffer (2X) นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที นำไปหยอดในช่องเจลที่เตรียมไว้

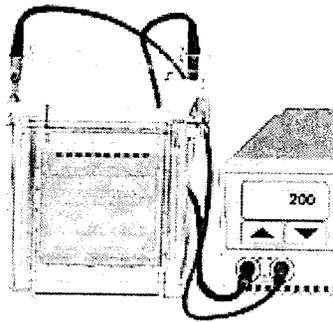


รูปที่ 3.2 การใส่ sample ลงในช่องที่เตรียมไว้ของเครื่อง gel electrophoresis

([http://www.bme.gatech.edu/vcl/SDS\\_PAGE/Background/Assets/PowerSup1.gif](http://www.bme.gatech.edu/vcl/SDS_PAGE/Background/Assets/PowerSup1.gif))

### 3.3.5.5 Running

หลังจากหยอดสารละลายตัวอย่างแล้ว นำไปต่อกับขั้วไฟฟ้า 200 V ดังแสดงดังรูปที่ 2.3. รอนจนกระทั่งโปรตีนเคลื่อนที่ไปสู่ด้านล่างของเจล ใช้เวลา 40-60 นาที



รูปที่ 3.3 การต่อเข้ากับขั้วไฟฟ้าของเครื่อง SDS-PAGE สำหรับแยกโปรตีน

([http://www.bme.gatech.edu/vcl/SDS\\_PAGE/Background/Assets/PowerSup1.gif](http://www.bme.gatech.edu/vcl/SDS_PAGE/Background/Assets/PowerSup1.gif))

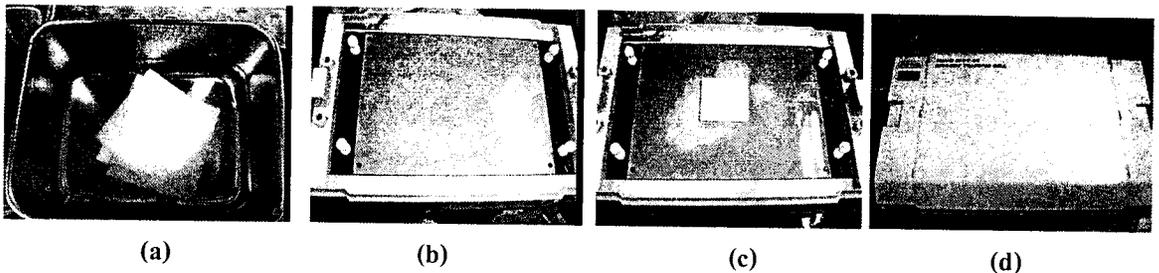
เมื่อสารละลายโปรตีนเคลื่อนมาถึงด้านล่างของ separating gel จะดึงสวิทช์ออก แล้วค่อยๆ แกะแผ่นเจลที่มีโปรตีนติดอยู่มาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อรอขั้นตอนการย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงสู่แผ่นเมมเบรน

### 3.3.5.6 การย้อมและการล้างสีโปรตีน

เมื่อสารละลายโปรตีนเคลื่อนมาถึงด้านล่างของ separating gel แล้ว จะดึงสวิตช์ออก นำเจลแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์แล้วทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

#### (1) เตรียมเมมเบรนและ transfer cell

ตัดแผ่นเมมเบรนขนาด (6×6cm) นำไปแช่ในสารละลายเมทานอล 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น นำเมมเบรนไปแช่อีกครั้งในสารละลาย blotting solution pH 8.3 จนกว่าจะใช้ดังแสดงในรูปที่ 3.4



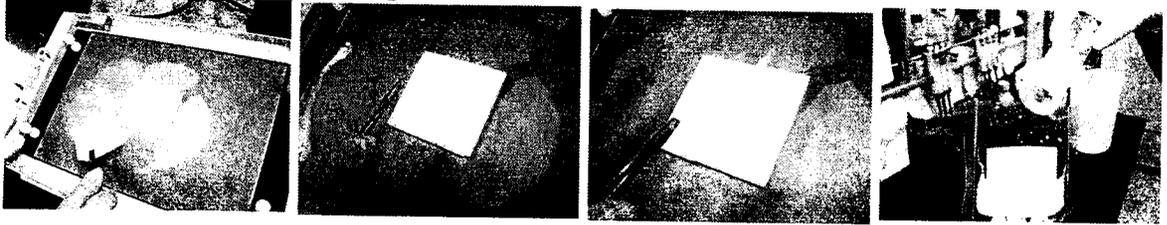
รูปที่ 3.4 การเตรียมเมมเบรนและการเตรียมเครื่อง transfer cell ก่อนทำ western blotting (a) เมมเบรนที่แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (b) เปิดฝาเครื่อง transfer cell (c) วางกระดาษกรอง, วางเจลที่มีโปรตีนติดอยู่ และวางเมมเบรนซ้อนกัน (d) ปิดฝาเครื่อง transfer cell

#### (2) ถ่ายโปรตีนจากเจลไปสู่เมมเบรน

เปิดฝา Transfer cell (รูปที่ 3.5) และวางกระดาษกรองที่เปียกลงบนเครื่อง ค่อยๆวาง SDS-PAGE gel ลงบนกระดาษกรองที่เปียก และควรเท blotting solution ลงไปให้เจลเปียกอยู่ตลอดเวลา ค่อยๆ วางเมมเบรนลงบน SDS-PAGE gel แล้ววางกระดาษกรองปิดทับเมมเบรนอีกครั้ง การประกอบมีลักษณะเหมือนแซนด์วิช ใช้แท่งปิเปตค่อยๆ กดทับด้านบนเพื่อไล่ฟองอากาศ รวด blotting solution อีกครั้ง ปิดฝา transfer cell เสียบปลั๊กใช้กระแสไฟฟ้าที่ 45 V และ current 72 mA นาน 1.30 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาแล้วค่อยๆ ใช้คีมคีบเฉพะเมมเบรน (รูปที่ 3.5 a-b) มาใส่ในถุงพลาสติก (heat-sealable plastic bag) ที่เติมสารละลาย 10 ml 5% BSA เพื่อเป็นการป้องกันโปรตีนอื่นที่มาจากป่นเปื้อน เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C เป็นเวลา 1 คืน

### (3) ขั้นตอน membrane blocking



(a)

(b)

(c)

(d)

รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการทำให้เมมเบรนปราศจากโปรตีนชนิดอื่น (membrane blocking) (a) เปิด transfer cassette และคีบ filter paper ออกไปจากแผ่นเจล. (b) คีบ SDS-PAGE gel ออก (c) คีบ เฉพาะแผ่นเมมเบรนไปใส่ในถุง (d) เติม blocking solution ลงไปในถุงเพื่อกำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อน

### (4) ล้างเมมเบรน

ใช้คีมจับเมมเบรนออกจากถุงและนำมาล้างในภาชนะที่มีสารละลาย TBS-T นาน 15 นาทีเป็นจำนวน 3 ครั้ง บนเครื่องเขย่า

### (5) ตี GAD antibody

รินสารละลาย TBS-T ออก คีบเมมเบรนใส่ในถุงพลาสติกอีกครั้ง แล้วเติม 10 ml GAD antibody (ที่เจือจาง 1:5,000 ใน TBS-T) ปิดถุงและระวังฟองอากาศ นำไปเขย่าอย่างช้าๆ นาน 1.30 ชั่วโมง เพื่อให้ GAD antibody ติดกับโปรตีนที่สกัดได้

### (6) ล้างเมมเบรน

ใช้คีมจับเมมเบรนออกจากถุงและนำมาล้างในภาชนะที่มีสารละลาย TBS-T นาน 15 นาทีเป็นจำนวน 3 ครั้ง บนเครื่องเขย่า

### (7) ตี anti-rabbit antibody

รินสารละลาย TBS-T ออก คีบเมมเบรนใส่ในถุงพลาสติกใบใหม่อีกครั้งแล้วเติม 10 ml anti-rabbit antibody-coupled with horseradish peroxidases (เจือจาง 1:100,000 ในสารละลาย TBS-T) นำไปเขย่าอย่างช้าๆ นาน 1.30 ชั่วโมง เพื่อให้ anti-rabbit antibody ติดกับ GAD antibody ตัวแรก

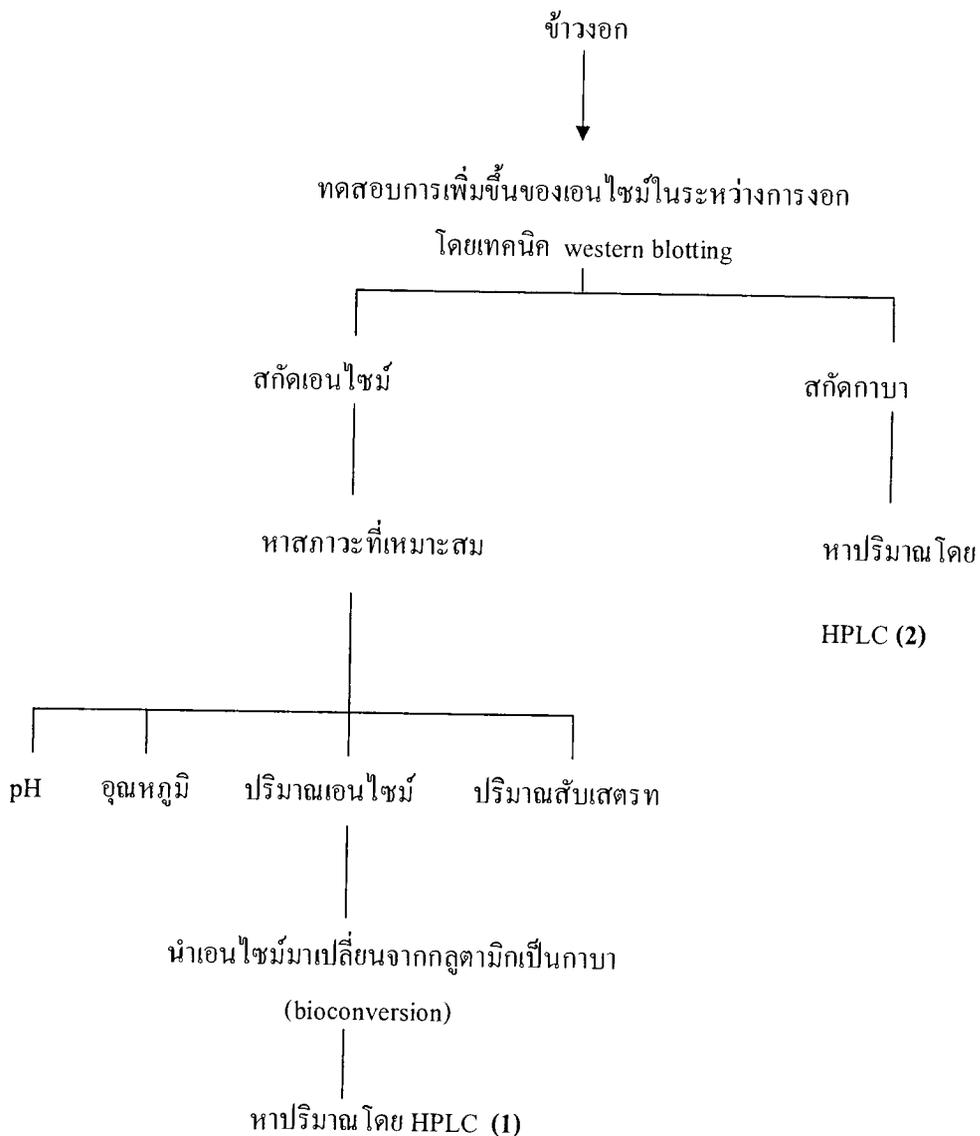
### (8) ล้างเมมเบรน

ใช้คีมจับเมมเบรนออกจากถุงและนำมาล้างในภาชนะที่มีสารละลาย TBS-T นาน 15 นาทีเพื่อล้าง anti-rabbit antibody เป็นจำนวน 3 ครั้ง บนเครื่องเขย่า

## (8) การตรวจสอบโปรตีนที่พบ

รินสารละลาย TBS-T ออกจากเมมเบรน เติม developing reagent ที่ประกอบด้วย (1 ml solution A: 25  $\mu$ l Solution B; ECL plus western blotting-detection kit) ให้ทั่วแผ่นเมมเบรน นาน 5 นาที ในที่ไม่มีแสงรบกวน ดูภายใต้เครื่อง LAS-3000 mini chemiluminescence's detector ทั้งนี้ จะพบแถบของ GAD โปรตีนเรืองแสงขึ้นมา

จากวิธีทำทั้งหมดได้สรุปแผนผังการดำเนินงานวิจัย ดังนี้



เปรียบเทียบกาบาระหว่างการทำปฏิกิริยา bioconversion (1) และสกัดโดยตรงจากข้าวที่งอก (2)

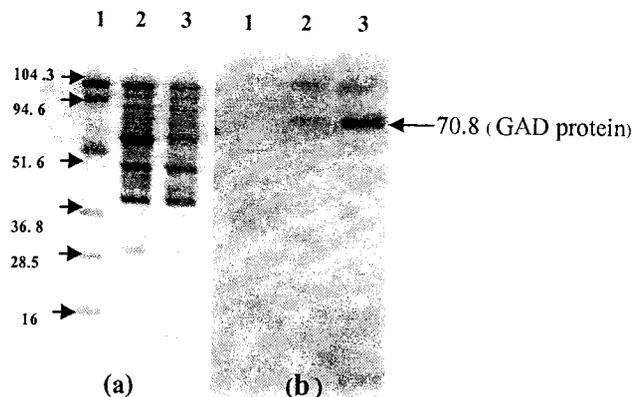
รูปที่ 3.6 สรุปแผนผังการดำเนินงานวิจัย

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 การติดตามการแสดงออกของเอนไซม์กลูตาเมตทีคาร์บอกซีเลส

ในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค western blotting ในการตรวจหาเอนไซม์กลูตาเมตทีคาร์บอกซีเลสที่อยู่ในรูปของ GAD protein ในข้าวที่งอกเปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่งอก เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานนำไปสู่การทดลองขั้นต่อไป โปรตีนที่สกัดจากข้าวถูกแยกบน 10%SDS-PAGE (รูปที่ 4.1a) และย้ายโปรตีนไปสู่ Hybond-P PVDF เมมเบรน (รูปที่ 4.1b) จากนั้นใช้ anti-GAD monoclonal antibody และ horseradish peroxidase-labelled a second antibody ที่จับจำเพาะเป็นตัวติดตาม GAD protein พบว่ามีการเรืองแสงของแถบ GAD protein เป็นแถบเดี่ยวภายใต้ chemiluminescence detector ดังแสดงในรูปที่มีขนาด ~70.8 kD เมื่อเทียบขนาดของโปรตีนมาตรฐานในเลนที่ 1 (รูปที่ 4.1b) ในขณะที่เลน 2 (ข้าวที่ไม่งอก) ปรากฏแถบของ GAD protein เช่นกัน แต่มีความเข้มน้อยกว่าเลนที่ 3 (ข้าวที่งอก) จากผลการตรวจสอบ GAD protein ในข้าวที่กำลังงอกด้วยเทคนิค western blotting นี้แสดงให้เห็นว่าข้าวที่กำลังงอกมีการแสดงออกของ GAD protein มากกว่าข้าวที่ไม่งอก ดังนั้นจะสกัดเอนไซม์ GAD จากข้าวที่งอกมาใช้ในการทดลองต่อไปได้มากกว่าข้าวที่ไม่งอก



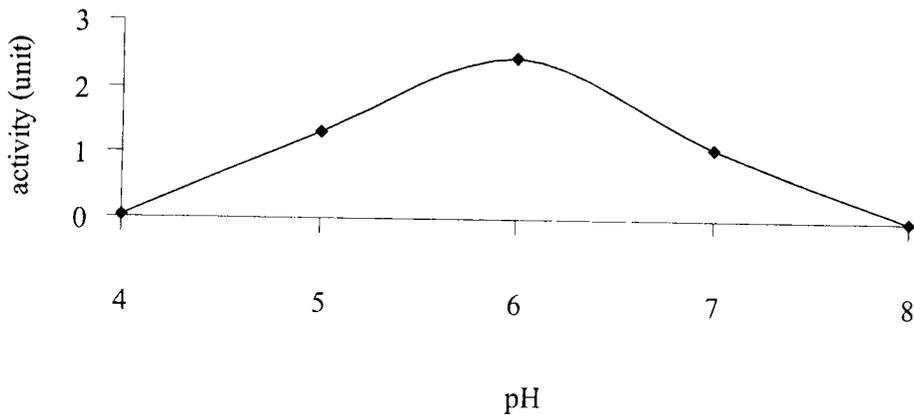
รูปที่ 4.1 แถบของ GAD protein ที่ปรากฏหลังจากการจับจำเพาะของ GAD antibody ; โดยที่ Lane (1), protein marker; Lane (2) โปรตีนที่สกัดจากข้าวที่ไม่งอก (control); Lane (3) โปรตีนที่สกัดจากข้าวที่งอกสายพันธุ์พิชญ์โลก (a) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel, (b) Hybond-P PVDF เมมเบรนที่ถูกจับด้วย anti-GAD monoclonal antibody ถูกสรแสดงตำแหน่งของ GAD protein ที่แสดงออกในข้าวที่กำลังงอก (RicGAD protein)

#### 4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซีเลส

งานวิจัยนี้ได้หาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น ปริมาณของเอนไซม์และ สับสเตรทที่เหมาะสม, เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา และค่า pH ที่เหมาะสม ของเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซีเลส การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) จะวัดปริมาณของ กาวาที่เป็นผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ชนิดนี้โดยใช้ HPLC

##### 4.2.1 ค่า pH ที่เหมาะสม

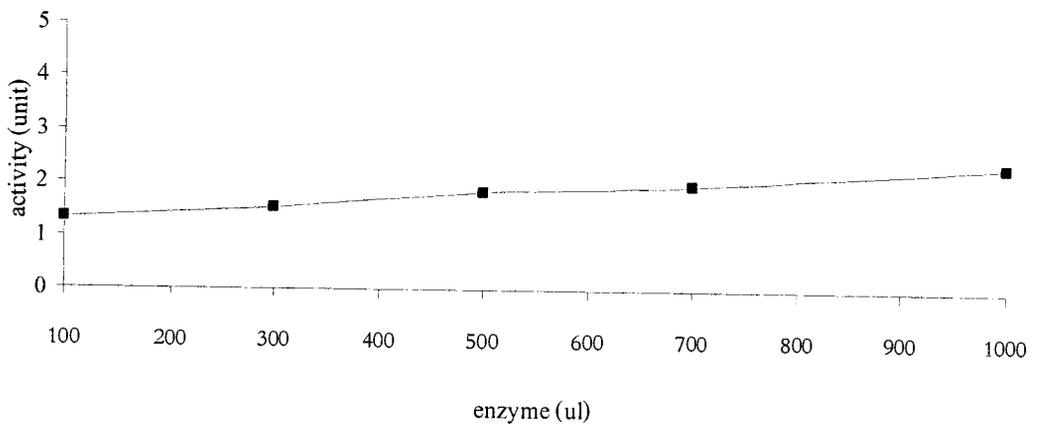
จากผลการหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่ค่า pH ที่แตกต่างกัน โดยใช้ สารละลายบัฟเฟอร์ปรับค่า pH ของปฏิกิริยา ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่า เอนไซม์ เอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซีเลสที่สกัดจากข้าวที่กำลังงอก สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนจาก กรดกลูตามิกเป็นกาวาได้มากที่สุด ภายใต้สภาวะที่ pH 6 ในหลอดทดลอง โดยที่ค่า pH ที่มากกว่า และน้อยกว่า 6 จะทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้ลดลง ยกตัวอย่างเช่น ความสามารถในการเปลี่ยนกรดกลูตามิกเป็นกาวาเข้าใกล้ 0 ที่ค่า pH 4 และ pH 8



รูปที่ 4.2 ค่า pH ที่แตกต่างกันที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตกาวา ของเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซีเลส

#### 4.2.2 ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนจากกรดกลูตามิกให้เป็นกาบานีน ได้ถูกติดตามโดยทดลองใช้ปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ 100, 300, 500, 700 และ 1000  $\mu\text{l}$  เติมลงไป ในหลอดทดลองที่มีกรดกลูตามิกที่มีความเข้มข้นคงที่ ในสภาวะ pH 6 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณกาบาที่เป็นผลิตภัณฑ์จะเพิ่มตามปริมาณเอนไซม์ที่เติมลงไปในช่วงแรกตั้งแต่ 100-500  $\mu\text{l}$  และเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์จนถึง 1000  $\mu\text{l}$  ปริมาณกาบาจะเพิ่มขึ้นในอัตราที่เริ่มคงที่ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.3 แต่อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่าอัตราการเพิ่มของปริมาณกาบาเริ่มคงที่เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น โดยสังเกตจากความชันของกราฟ



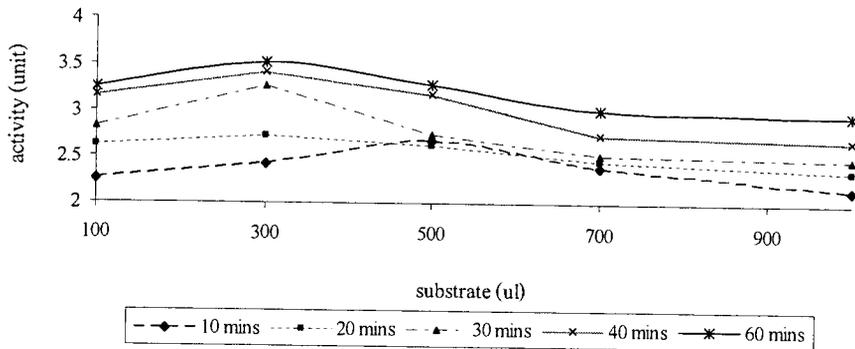
รูปที่ 4.3 ผลของการใช้ปริมาณเอนไซม์กลูตามิเดคาร์บอกซิเลสที่แตกต่างกัน ในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตกาบา

#### 4.2.3 ปริมาณสับสเตรทและเวลาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสม

เมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณของสับสเตรท (กรดกลูตามิก) ที่เป็นสารตั้งต้นของการเร่งปฏิกิริยาด้วย GAD enzyme ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน โดยใช้ปริมาณกรด กลูตามิกที่แตกต่างกันในช่วง 100-1000  $\mu\text{l}$  พบว่า ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามปริมาณสับสเตรทจนกระทั่งที่ปริมาณสับสเตรทมากกว่า 500  $\mu\text{l}$  ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเริ่มคงที่และลดลงเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.4.

เมื่อพิจารณาถึงเวลาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยา พบว่า เวลาการเร่งปฏิกิริยานานจะมีปริมาณกาบามากกว่าเวลาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาน้อย โดยจะเห็นปริมาณกาบาเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆจากระยะเวลาเริ่มต้น 10 นาที จนถึง 60 นาที โดยกราฟการเร่งปฏิกิริยาที่ 60 นาที มีความชันมากกว่าที่ระยะเวลาการเร่งปฏิกิริยาอื่นๆ

แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่า การเร่งปฏิกิริยาที่ 60 นาที จะทำให้เอนไซม์มี activity เท่ากับ 3.51 unit แต่ขณะที่ 40 นาที นั้นเอนไซม์มี activity เท่ากับ 3.42 unit ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้จะเลือกใช้ที่ 40 นาที เนื่องจาก enzyme activity ไม่แตกต่างกัน โดยใช้ปริมาณสับสเตรท 300  $\mu$ l ปริมาณเอนไซม์ 1000  $\mu$ l, pH 6 ที่อุณหภูมิคงที่ 40°C



รูปที่ 4.4 ปริมาณสับสเตรทและเวลาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กูดตามเทศีคาร์บออกซีเลส

#### 4.3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนจากกรดกลูตามิกเป็นกาบาโดยใช้เอนไซม์กูดตามเทศีคาร์บออกซีเลส

จากปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดกลูตามิกเป็นกาบาโดยใช้เอนไซม์กูดตามเทศีคาร์บออกซีเลสที่เหมาะสมที่ทำได้จากหัวข้อ 4.2-4.3 นั้น ในการเร่งปฏิกิริยา ขั้นตอนนี้จะสกัดเอนไซม์มาจากข้าวที่กำลังงอกที่ระยะเวลาการงอกที่แตกต่างกัน แล้วนำมาทดสอบเร่งปฏิกิริยา โดยมี PLP เป็นโคเอนไซม์ ได้ปริมาณกาบามากที่สุดเท่ากับ 1.43 mg/g ที่ใช้เอนไซม์ซึ่งสกัดจากข้าวที่งอก 5 วัน แต่เมื่อระยะเวลาการงอกของข้าวมากขึ้น เอนไซม์ที่สกัดได้จะมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาลดลง ซึ่งพิจารณาได้จากปริมาณกาบาที่ได้ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณกาบาที่พบหลังจากใช้เอนไซม์ที่สกัดจากข้าวที่งอกที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน

เอนไซม์ที่สกัดจากระยะเวลาที่ข้าวงอก (วัน)	ปริมาณกาบา (mg/g)
control	0
5	1.43
10	1.30
15	0.99
20	0.97
25	0.63
30	0.38

แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกาบาที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์นี้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับปริมาณกาบาที่สกัดจากข้าวที่งอกโดยตรงในหัวข้อ 4.4

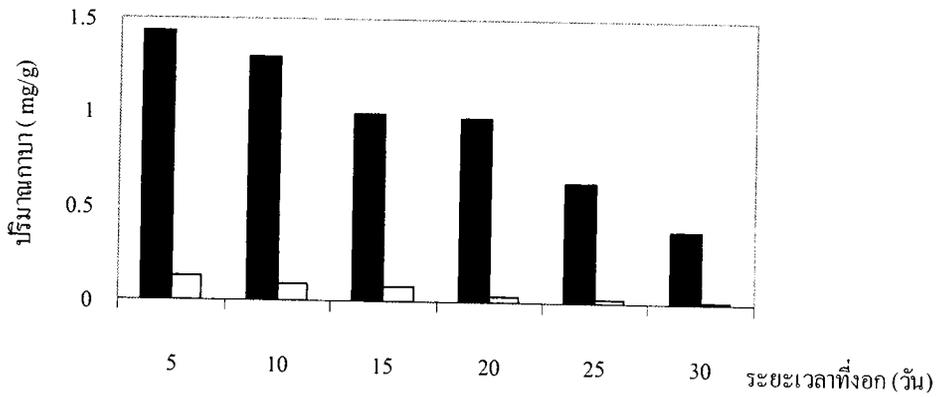
#### 4.4 ปริมาณกาบาที่สกัดจากข้าวที่กำลังงอก

ปริมาณกาบาที่สกัดได้โดยตรงจากข้าวที่งอกที่ระยะเวลา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 วันตามลำดับ ซึ่งพบว่าปริมาณกาบาในข้าวที่งอกจะเพิ่มขึ้นจากข้าวที่ไม่งอก (control) เท่ากับ 1.58-5.42 เท่า โดยพบปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 0.128 mg/g ที่ระยะเวลาการงอก 5 วัน และปริมาณกาบาจะค่อยๆลดลงเมื่อจำนวนวันงอกเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ปริมาณกาบาที่สกัดได้จากข้าวที่งอกที่ระยะเวลาการงอกแตกต่างกัน

ระยะเวลาที่ข้าวงอก (วัน)	ปริมาณกาบา (mg/g)
5	0.128
10	0.090
15	0.080
20	0.032
25	0.024
30	0.012

#### 4.5 เปรียบเทียบปริมาณกาบาจากการสกัดโดยตรงและจากการทำปฏิกิริยา bioconversion

จากตารางที่ 4.1 ได้สกัดเอนไซม์ที่ระยะเวลาการงอกที่แตกต่างกันแล้วนำมาประยุกต์ใช้ในการเปลี่ยนกรดกลูตามิกเป็นกาบา พบว่า ได้ปริมาณกาบาสูงสุดที่ 1.43 mg/g ของปริมาณข้าวที่นำมาสกัดเอนไซม์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกาบาที่สกัดได้โดยตรงจากข้าวที่กำลังงอกแล้วพบว่าปริมาณกาบาที่ต่ำกว่ากาบาที่ผลิตได้เองในหลอดทดลองภายใต้การเร่งปฏิกิริยา 40 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ปริมาณกาบาที่ได้จากสองวิธีที่ต่างกัน, □ = ปริมาณกาบาที่ได้จากการสกัดจากข้าวที่กำลังงอก ขณะที่ ■ = ปริมาณกาบาที่ได้จากการใช้เอนไซม์กูดามะดีคาร์บอกซีเลสเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะที่เหมาะสม

## บทที่ 5

### สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 การติดตามการแสดงออกของ GAD protein โดยใช้เทคนิค Western blotting

จากผลการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลส โดยใช้เทคนิค western blotting พบว่า ข้าวที่งอกแล้วมีปริมาณของเอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลสที่มากกว่า โดยสังเกตแถบของโปรตีนกลูตาเมตติคาร์บอกซีเลส (เลนที่ 3) มีสีเข้มมากกว่าข้าวที่ไม่งอกในเลนที่ 1 (รูปที่ 4.1) Komatsuzaki *et al.*, (2007) ได้เสนอว่า การดูดซับน้ำของเมล็ดในระหว่างที่แช่น้ำในกระบวนการงอกนั้นจะกระตุ้นให้เอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลสมีการทำงานที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการสกัดเอนไซม์กลูตาเมตติคาร์บอกซีเลสควรจะสกัดในช่วงเวลาที่ข้าวกำลังงอก

#### 5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรม (activity) ของ GAD enzyme

หลังจากที่สกัดเอนไซม์จากข้าวที่กำลังงอกนั้นแล้วนำไปเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดกลูตามิกเป็นกาบาที่สภาวะต่างๆ กันที่ pH 4, 5, 6, 7, 8 พบว่า ที่สภาวะ pH 6 เป็นกรดอ่อน เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดมากกว่าที่ค่า pH อื่น และแสดงให้ว่า pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ เพราะ ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาที่พบในงานวิจัยแตกต่างกับงานวิจัยที่ผ่านมา เช่นในแบคทีเรียพบค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับ GAD อยู่ในช่วง 3.5-5, สำหรับพืชอยู่ในช่วง 5.5-6.5 และค่า pH ที่เหมาะสมในช่วง 6.8-7.0 สำหรับเอนไซม์ GAD ที่พบในสัตว์ (Matsumoto *et al.*, 1986; Satyanarayan and Nair., 1985) นอกจากนี้ Saikusa *et al.*, (1994) พบว่า ปริมาณกาบาเพิ่มขึ้นอย่างมากในเมล็ดข้าวที่แช่น้ำในสภาวะที่ค่า pH เป็นกรด แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ GAD ทำงานได้ดีในสภาวะ pH ที่เป็นกรด ซึ่งแตกต่างจากข้าวที่กำลังงอกในการวิจัยนี้ที่พบว่าเมื่อสภาวะเป็นกรดมากเช่น pH 4 เอนไซม์จะไม่สามารถทำงานเร่งปฏิกิริยาเพื่อผลิตกาบาได้ (รูปที่ 4.2) ดังนั้นถึงแม้ว่าจะสกัด GAD เอนไซม์จากข้าวเหมือนกัน แต่ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

เวลาที่ใช้เร่งปฏิกิริยาถูกศึกษาตั้งแต่ 10 นาที-60 นาที พบว่า ถ้าเวลานานมากขึ้น เอนไซม์จะมีโอกาสสัมผัสกับกรดกลูตามิกที่เป็นสับสเตรทได้นาน ทำให้ผลิตกาบาได้ปริมาณมากกว่า ให้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.4 กราฟที่แสดงเวลาในการทำปฏิกิริยา 60 นาที จะมีความเข้มข้นมากกว่าและให้ปริมาณกาบามากกว่าที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาน้อยกว่า

นอกจากนี้ยังได้เปลี่ยนแปลงปริมาณกรดกลูตามิกที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ที่สกัดได้ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์คงที่ 1000  $\mu$ l แล้วเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดกลูตามิก 100  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 700  $\mu$ l, และ 1000  $\mu$ l ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ถ้าเพิ่มปริมาณกรดกลูตามิกในช่วง 100-300  $\mu$ l เอนไซม์จะทำงานได้มากขึ้น แต่ถ้าเพิ่มกรดกลูตามิกจนถึง 500-1000  $\mu$ l พบว่า ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์คงที่ ทั้งนี้เป็นเพราะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบ substrate inhibition คือ มีปริมาณสับสเตรตมากเกินไปที่จะทำให้ปฏิกิริยากับเอนไซม์ ทำให้อ้อมตัวผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงเริ่มคงที่ จนกระทั่งเริ่มลดลง (รูปที่ 4.4)

ในขณะที่การทดลองที่ 4.2.2 ถึงแม้ว่าปริมาณเอนไซม์ที่เติมลงไปสูงสุดคือ 1000  $\mu$ l จะทำให้ได้ปริมาณกาบามากที่สุด แต่เมื่อพิจารณาจากความชันของกราฟจะเห็นว่าเริ่มลดลงเมื่อเติมเอนไซม์มากขึ้น ดังนั้นถ้าเติมเอนไซม์ลงไปมากกว่า 1000  $\mu$ l จะไม่มีผลทำให้กาบาเพิ่มขึ้นมาก เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไปต่อปริมาณสับสเตรตที่มีอยู่ การทดลองนี้จึงไม่เติมเอนไซม์ไปมากกว่า 1000  $\mu$ l

### 5.3 ปริมาณกาบาที่พบในข้าวที่งอก

ในงานวิจัยได้สกัดกาบาจากข้าวที่กำลังงอกด้วย 70% ethanol เนื่องจากอ้างอิงจากวิธีของ Baum *et al.*, 1996; Oh and Choi 2001; Komatsuzaki *et al.*, 2007 เพราะเป็นวิธีที่นอกจากจะสกัดกาบาได้แล้ว ยังสามารถสกัดกรดอะมิโนและสารประกอบในโตรเจนอื่น ออกมาจากข้าวที่กำลังงอกได้ในคราวเดียวกัน จึงเป็นสถานะที่เหมาะสมมากกว่าที่จะใช้ตัวทำละลายที่สกัดกาบาจากข้าวได้เพียงชนิดเดียว ขณะที่หาปริมาณกาบาในข้าวที่งอกที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า กระบวนการงอกของข้าวทำให้ปริมาณกาบาในข้าวเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่งอก (control) ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และ 4.5 ผลการวิจัยสอดคล้องกับ Oh and Choi, (2001) ที่พบปริมาณกาบาในข้าวกล้อง, ข้าวบาร์เลย์ และถั่วเหลือง หลังจากกระบวนการงอกมากกว่าในขณะที่ยังไม่งอก นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับข้าวกล้องของสายพันธุ์ของเกาหลีและญี่ปุ่น ที่มีปริมาณกาบาเพิ่มขึ้นมากกว่าข้าวที่ไม่งอก 13 และ 3.41 เท่า ตามลำดับ (Oh *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2006). ในขณะที่ พบปริมาณกาบาเพิ่มขึ้น 11-17 เท่า และ 18 เท่า ในถั่วเหลืองที่งอก [*Glycine max* (L.) Merr] และ ข้าวสาลีที่งอกเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่งอก (Oh and Choi, 2001; Nagaoka *et al.*, 2005) ตามลำดับ เนื่องจากระหว่างการงอกซึ่งเป็นสถานะที่มีน้ำ เอนไซม์หลายชนิดในเมล็ดข้าวจะถูกกระตุ้น เช่น เอนไซม์ GAD หลังจากนั้นเอนไซม์จะเปลี่ยนกรดกลูตามิกเป็นสารกาบา (Komatsuzaki *et al.*, 2007) เหตุผลอื่นที่อธิบาย เช่น ในระหว่างการงอกมีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมตาบอลิซึมในเมล็ด

ทำให้สารอาหารที่เก็บสะสมในเมล็ดถูกย่อยให้มีโมเลกุลเล็กลง จนกระทั่งเกิดการสะสมของสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้ เช่น กาบ (Mayer and Mayber, 1982).

Kuo *et al.*, 2004 ได้เสนอเหตุผลที่สอดคล้องกัน คือ สารอาหารที่เก็บสะสมในเมล็ดจะถูกย่อย เป็นสับสตรทให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนและสารประกอบอื่นๆ ไปพร้อมๆ กับการเกิดกระบวนการงอก

นอกจากนี้ Komatsuzaki *et al.* (2007) เสนอแนะว่า โปรตีนที่เก็บสะสมได้ถูกย่อยสลาย เนื่องจากการบวมตัวของเมล็ดในระหว่างการงอก ได้เปลี่ยนไปเป็นสารประกอบจำพวกเอไมด์ เช่น กาบ ใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนสำหรับเลี้ยงต้นอ่อนของข้าวที่กำลังงอก

แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกาบที่เพิ่มขึ้นนี้จะลดลงหลังจากเวลา 10 วันหลังการงอก ทั้งนี้จะเป็นเพราะกาบถูกใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนสำหรับการเจริญของต้นอ่อน หรือเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบ Succinic semialdehyde (SSA) โดยเอนไซม์ GABA-T และเอนไซม์ SSADH ในวัฏจักรเครบส์ บริเวณไมโทคอนเดรียของเซลล์พืช (Kono and Himeno, 2000; Huang *et al.*, 2007).

ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจต่อไปว่าถ้ามีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GABA-T และเอนไซม์ SSADH ได้แล้วนั้น จะทำให้มีปริมาณกาบที่เพิ่มขึ้นจนสูงสุดและไม่ลดลง

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกาบในข้าวในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ เช่น ข้าวสายพันธุ์จาปอนิกาที่แช่น้ำเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่ 30°C มีปริมาณกาบ 1.49 mg/g แต่เมื่อนำมาแช่น้ำและเติมก๊าซลงไปพบว่าปริมาณเพิ่มถึง 2.49 mg/g (Ohtsubo *et al.*, 2005; Komatsuzaki *et al.*, 2007) และข้าวสายพันธุ์เกาหลี มีปริมาณ 0.207 mg/g (Oh, 2003) ทั้งนี้เป็นเพราะการที่ข้าวกำลังงอกแล้วมีก๊าซผสมอยู่นั้นจะช่วยลดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการงอก เนื่องจากการหมักมีผลทำให้ปริมาณกาบลดลงในระหว่างการงอก (Komatsuzaki *et al.*, 2007)

ขณะที่กาบที่พบในงานวิจัยนี้แตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมา ทั้งนี้เป็นเพราะวิธีการทำให้งอก ระยะเวลาการงอก สายพันธุ์ข้าว และอุณหภูมิที่ใช้ในการงอกแตกต่างกัน เหตุผลอื่นที่ใช้สนับสนุนได้แก่ ข้าวสายพันธุ์ที่มีขนาดของเอมบริโอขนาดใหญ่จะมีปริมาณกาบเพิ่มขึ้นปริมาณมากกว่าข้าวที่มีขนาดเอมบริโอขนาดเล็ก หลังจากการแช่น้ำที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง (Matsuo *et al.*, 1997) และสอดคล้องกับข้าวสายพันธุ์ *O. sativa* และ ข้าวญี่ปุ่นหลายๆสายพันธุ์ (*O. sativa* var *japonica*.) ที่ถูกปรับปรุงพันธุ์ให้มีขนาดเอมบริโอขนาดใหญ่จะพบปริมาณกาบและสารอาหารที่สำคัญเพิ่มขึ้นอย่างมากในระหว่างการงอก (Zhao and Jiang, 2002).

#### 5.4 เปรียบเทียบปริมาณกาบา

จากการสกัดกาบาจากข้าวที่กำลังงอก พบว่า มีปริมาณกาบามากที่สุด 0.128, 0.09, 0.08, 0.03, 0.024 และ 0.012 ที่ระยะเวลาการงอก 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 วัน ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Oh และ Choi, (2001) ที่พบว่าปริมาณกาบาจะเพิ่มขึ้นจากการงอกของข้าวข้าวบาร์เลย์ และถั่วเหลือง โดยงานวิจัยนี้พบปริมาณกาบามากที่สุดที่ 0.128 mg/g ที่ระยะเวลาการงอก 5 วัน หลังจากระยะเวลา 5 วัน จะเริ่มลดลงไปเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงเวลาการงอกที่ 30 วัน ทั้งนี้ น่าจะเป็นเพราะกาบาที่จัดว่าเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจน ถูกใช้ในการเจริญเติบโตของต้นอ่อน และส่วนที่เจริญเป็นลำต้นของข้าว ทำให้ปริมาณของกาบาในเมล็ดลดลงเมื่อระยะเวลาการงอกนานขึ้น (Kigel and Galili, 2003).

นอกจากนี้ที่ระยะเวลาการงอกนานขึ้น จะพบว่าเมล็ดข้าวจะมีเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากปริมาณแป้งในเมล็ดลดลง และยังพบปริมาณกาบาที่ลดลงเหลือเท่ากับ 0.012 mg/g

แต่อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาที่เหมาะสมกับการบริโภคจะอยู่ในช่วงการงอกที่ระยะเวลา 5 วัน เพราะเมล็ดมีความสมบูรณ์และมีปริมาณแป้งที่จะบริโภคได้ อีกทั้งยังพบปริมาณกาบาที่ 0.128 mg/g

นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังประยุกต์ใช้เอนไซม์กลูตามาเทคคาร์บอกซีเลสที่แสดงออกมามากในข้าวที่กำลังงอก (จากผลการทำ western blotting ในผลการทดลองที่ 4.1) โดยทำให้ข้าวงอกแล้วสกัดเอนไซม์มาใช้เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดกลูตามิกเป็นกาบา พบว่า สามารถใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการผลิตกาบาในหลอดทดลองได้ และเริ่มคงที่ตั้งแต่ 40 นาที โดยเอนไซม์ที่ระยะเวลาการงอกที่ 5 วัน จะมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด และได้ปริมาณกาบาเท่ากับ 1.43 mg/g และที่ระยะเวลาการงอกนานขึ้น ความสามารถของเอนไซม์ที่สกัดได้จะลดลงไป จึงเสนอแนะว่าระยะเวลาการงอกในช่วง 5 วันแรกของการงอก เป็นช่วงที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์เพื่อนำมาประยุกต์ใช้

### ข้อเสนอแนะ

1. การสกัดเอนไซม์ที่ระยะเวลา 5 วัน สามารถนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาการผลิตกาบาได้มากกว่า การสกัดกาบาโดยตรงจากข้าวที่งอกที่ระยะเวลา 5 วัน ถึง 11.17 เท่า ดังนั้นจึงเป็นที่ น่าสนใจที่จะผลิตกาบาในหลอดทดลองและแปรรูปในผลิตภัณฑ์ผง ให้ผู้ที่สนใจนำไปเติมลงใน อาหารในรูปของกาบา หรือมีแนวการเพิ่มปริมาณกาบาในอาหารมีองค์ประกอบของอาหาร (food matrix) ที่ซับซ้อนยกตัวอย่างเช่น

1.1 การทำขนมปังที่มีกาบาสูง โดยมีรายงานการวิจัยที่ทดลองทำขนมปังที่มีกาบาสูงโดยเติม เอนไซม์ GAD ที่สกัดได้จากยีสต์ (*Yersinia intermedia*) ปริมาณ 1.5, 4.5 และ 12.5 ยูนิต ลงไปพร้อมกับเติมโซเดียมกลูตาเมตที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (100, 220 และ 380 ppm) ต่อ ปริมาณแป้งข้าวสาลี 10 กรัม ในระหว่างการบ่มแป้งนั้นพบว่าปริมาณกาบาสูงขึ้น (Lambert *et al.*, 2012)

1.2 การทำ breakfast cereals ที่มีปริมาณกาบาสูง เริ่มจากชั้นตอนเติมเอนไซม์ GAD ที่สกัด ได้จากยีสต์ (*Y. intermedia*) เติมโซเดียมกลูตาเมตที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ลงไปในสูตรที่มี แป้งเป็นองค์ประกอบผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 30 นาที และ 75 นาที ตามลำดับ พบว่ามีปริมาณกาบาเพิ่มขึ้น 5 เท่า จากปริมาณเดิมที่พบอยู่ในแป้งที่เป็นส่วนผสมหลัก แต่หลังจาก ที่นำไปผ่านกระบวนการ extrusion (160-180 °C) ที่เวลา 30 นาที และ 75 นาที ปริมาณลดลง 15% (Joye *et al.*, 2012) ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการเพิ่มปริมาณกาบาในอาหารที่ต้องใช้ความร้อนสูงใน กระบวนการผลิต

2. สำหรับผู้ที่ต้องการรับประทานข้าวที่มีกาบาสูงและผู้ที่ต้องการจะทำบริสุทธิ์เอนไซม์ GAD ควรสกัดมาจากข้าวที่กำลังงอกให้ระยะเวลาการงอกไม่เกิน 5 วัน
3. ควรมีการนำข้าวที่มีกาบาสูงไปทดสอบกับเซลล์เนื้อเยื่อสมองที่ผิดปกติหรือหนู (mouse) ที่มีความจำเสื่อม ตลอดจนศึกษาการยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งต่อไป

### บรรณานุกรม

1. พัชรา วีระกะลัส. (2543). เอนไซม์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ
2. ดาวลัย ฉิมภู. (2543). ชีวเคมี. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. พิษณุโลก
3. ฤดีวรรณ บุญยรัตน์. (2533). ชีวเคมี-ชีวโมเลกุล. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม. พิษณุโลก
4. Akama, K., Akihiro, T., Kitagawa, M., and Takaiwa, F. (2001). Rice (*Oryza sativa*) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus. *Biochem. Biophys. Acta.* 1522, 143-150.
5. Akama, K., and Takaiwa, F. (2007). C-terminal extension of rice glutamate decarboxylase (OsGAD2) functions as an autoinhibitory domain and overexpression of a truncated mutant results in the accumulation of extremely high levels of GABA in plant cells. *J. Exp. Bot* 22,1-9.
6. Allan, W.L., and Shelp, B.J. (2006). Fluctuations of gamma-aminobutyrate, gamma hydroxybutyrate, and related amino acids in Arabidopsis leaves as a function of the light-dark cycle, leaf age, and N stress. *Can. J. Bot.* 84, 1339-1346.
7. Aoki, H., Uda, I., Tagami, K., Furuya, Y., Endo, Y., and Fujimoto, K. (2003). Production of a new Tempeh-like fermented soybean containing a high level of gamma-aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1018-1023.
8. Bautista, G.M. (1994). Glutamic acid decarboxylase activity as a viability index of artificially dried and stored rice. *Cereal Chem.* 41,188-191.
9. Bouché, N., and Fromm, H. (2004). GABA in plants: just a metabolite? *Trends. Plant. Sci.* 9, 3, 109-115.
10. Brenda. 2009. "GABA structure". [online]. Available [http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=information/all\\_enzymes.php4?e\\_no=1.2.1.24](http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=information/all_enzymes.php4?e_no=1.2.1.24) . (3 August 2009).
11. Brown, A.W. Macgregor, K.B., and Shelp, B.J. (2006). Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests?. *Trends. Plant. Sci.* 11, 424-427.

12. Clibnall, A.C. (2003) . Protein metabolism in plant, 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press.,Dekker, Inc., New York, pp.17-21, 103-138, 791-809.
14. Fernie, A.R. and Galili, G. (2006). Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant .Physiol.* 142, 839-854
15. Fernie, A.R., Roscher, A., Ratcliffe, R.G., and Kruger, N.J. (2001). Fructose gamma-hydroxybutyrate, and related amino acids in Arabidopsis leaves as a function of the light-dark cycle, leaf age, and N stress. *Can. J. Bot.* 84, 1339-1346.
16. Geigenberger, P., and Stitt, M. (1993). Sucrose synthase catalyses a readily glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant. Cell. Environ.* 25, 1451-1462.
17. Helel, A. (1996). Mobilization of starch and protein in germinating rice grains. *J.king. Saud. Univ.* 8, 2, 127-138.
18. Horikoshi, I., and Morita, Y. (1982). Changes in Infrastructure and Subunit Composition of Protein Body in Rice Endosperm during Germination. *Agric. Biol. Chem.* 46, 1, 269-274.
19. Huang, J., Mei, L.H., Wu, H., and Lin, D.Q. (2007). Biosynthesis of gamma-aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 865-871.
20. Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Hayakawa, K., Kimura, M., and Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensive. *Eur J. Clin. Nutr.* 57, 490-495.
21. Joye, I.J., Lamberts, L., Brijs, K., Delcour, J.A. (2011). In situ production of gamma-aminobutyric acid (GABA) in breakfast cereals. *Food Chem.* 129, 2, 395- 401.
21. Kato-Noguchi, H., and Ohashi, C. (2005). Anoxic accumulation of amino acids in rice coleoptiles. *Environ. Control. Biol.* 43, 291-294.
22. Kigel, J., and Gallli, G. : Seed development and germination, 1st ed. Marcel H. Milford, pp. 306, 1939.
23. Kinnersley, A.M., and Turano, F.J. (2000). Gamma-aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 19, 479-509.
24. Komatsuzaki, N., Tsukahara, K., and Toyoshima, H. (2007). Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. *J. Food. Microbiol.*78, 556-560

25. Kono, I., and Himeno, K. (2000). Change in gamma-aminobutyric acid content during benikoji making. *Biosci. Biotechnol. BioChem.* 64, 617-619.
26. Lamberts, L., Joye, I.J., Belin, T., Delcour, J.A. (2012). Dynamics of gamma-aminobutyric acid in wheat flour bread making. *Food Chem.* 130, 896-901.
27. Lu, X., Chen, Z., Gu, Z., and Han, Y. (2008). Isolation of gamma-aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochem Eng J.* 41, 48-52.
28. Masclaux-Daubresse, C. (2002). Diurnal changes in the expression of Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 6843-6848
29. Oh, S.H., and Choi, W.G. (2001). Changes in the levels of gamma-aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in developing soybean seedlings. *J. Plant. Research.* 114, 309-313.
30. Ohtsubo, K., Suzuki, K., Yasui, Y., and Kasumi, T. (2005). Bio-functional origin, history, technology and production, 1st ed, John Wiley & Son, Inc., New Jersey, pp.132-135, 2003.
31. Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F., and Preuss, D. (2003). Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. *Cell.* 114, 47-59.
30. Panatda, J., Hataichanoke, N., Saisamorn, L., Suzuki, T., Katayama, T and Chairote, G. (2011). Comparison of gamma-aminobutyric acid (GABA) production in Thai rice grains. *World J. Microbial. and Biotech.* DOI 10.1007/s11274-009-0168-2.
31. Park, K.B., and Oh, S.H. (2006). Enhancement of gamma-aminobutyric acid production in chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnol. Lett.* 28, 1459-1463
32. Park, K.B., and Oh, S.H. (2007). Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresour. Technol.* 98, 1675-1679
33. Reggina, R., Nebuloni, V., and Brambilla, I. (2000). Anaerobic reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta.* 189, 329-339.
34. Saikura, T., Horino, T. and Mori, Y. (1994). Accumulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 2291-2292.

35. Shelp, B.J., Bown, A.W. and McLean, M.D. (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends. Plant. Sci.* 4, 447-451.
36. Siragusa, S., Angelis, M.D., Cagno, R.D., Rizzello, C.G., Coda, R., and Gobbetti, M. (2007). Synthesis of gamma-aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 7283-7290.
37. Smith, C.W., and Dilday, R.H. : Germination and seedling development. Rice, *J.king. Saud. Univ*, 8, 2, 127-138.
38. Sodek, L., Lea, P.J., and Mifflin, B.J. (1980). Distribution and properties of a storage proteins in developing rice seeds. *Plant. Physiol.* 70, 1094-1100.
39. Su, Y.C., Wang, J.J., and Lin, T.T. (2003). Production of the secondary metabolites gamma aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *J. Ind Microbiol. Biotechno.* 30, 41-46.
40. Takahashi, N., Matsuo, T., Kumazawa, K., Ishii, R., Ishihara, K., and Hirata, H. (1995). Physiology of seed germination. In Science of rice plant. *Physiol.Food.Agric. Policy. Researcenter.* 2, 35-45.
40. Takahashi, T., Furukawa, A., Hara, S., and Mizoguchi, H. (2004). Isolation and characterization of sake yeast mutants deficient in gamma-aminobutyric acid utilization in sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.* 97, 412-418
41. Yamagata, H., Sugimoto, T., Tanaka, K., and Kasai, Z. (1982). Biosynthesis of Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. *Plant. Physiol.* 70, 1094-1100.
42. Yun, S.J. and Oh, S.H. (1998). Cloning and characterization of a tobacco cDNA encoding calcium/calmodulin-dependent glutamate decarboxylase. *Mol. Cells*, 8, 125-129.
43. Zhang, H., Yao, H.Y., and Chen, F. (2006). Accumulation of gamma-aminobutyric acid in rice germ using protease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1160-1165.
44. Zhang, H., Yao, H.Y., Chen, F., and Wang, Xi. (2007). Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ. *Food. Chem.* 101, 1670-1676.
45. [http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=information/all\\_enzymes.php4?e\\_no=1.2.1.24](http://www.brendaenzymes.info/index.php4?page=information/all_enzymes.php4?e_no=1.2.1.24)
46. <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/transkinetics/olinhhibition.htm>
47. [http://www.genome.jp/dbgethin/www\\_bget?K00823+2.6.1.19+R01648](http://www.genome.jp/dbgethin/www_bget?K00823+2.6.1.19+R01648)

## ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว ปนัดดา จันทร์เนย (หัวหน้าโครงการวิจัย)  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Panatda Jannoey
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 36407 00381 146
3. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน พนักงานมหาวิทยาลัยสายวิชาการ
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e - mail)

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม  
E-mail: kek\_biotech@hotmail.com

## 5. ประวัติการศึกษา

- |                         |  |
|-------------------------|--|
| 2545                    | ปริญญาตรี สาขา ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี (Biochemistry and Biochemical technology) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ |
| 2547                    | ปริญญาโท สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology) คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่                                    |
| 2552                    | ปริญญาเอก สาขา ชีวเคมี (Biochemistry) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่   |
| Certificate (2551-2552) | Department of life science, Kagawa University, Japan   |

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ  
Enzyme, Rice chemistry

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ ; ผลงานวิจัยตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 5 ปี ย้อนหลัง ; (เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย)

1. **Panatda Jannoey**, Hataichanoke Niamsup, Saisamorn Lumyong , Toshisada Suzuki , Takeshi Katayama and Griangsak Chairote. Comparison of gamma-aminobutyric acid (GABA) production in Thai rice grains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010: 26(2):257-263.

2. **Panatda Jannoey** , Hataichanoke Niamsup, Saisamorn Lumyong, Mika Nomura, Shideyugi Tajima and Griangsak Chairote. gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Accumulations in Rice During Germination . *Chiang Mai J. Sci.* 2010; 37(1) : 124-133.

#### 8; แหล่งทุนที่สนับสนุนงานวิจัย

1. ทุนวิจัยจากรัฐบาลประเทศญี่ปุ่นเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ประจำปี พ.ศ. 2552 (JSPS; Exchange Program for Asian Young Researchers Scholarship, 2009)
2. ทุนการศึกษาระดับปริญญาเอก จากศูนย์ความเป็นเลิศและนวัตกรรมทางเคมี ระยะเวลา พ.ศ. 2549-2551 (Center for innovation in Chemistry: Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH-CIC) Scholarship, 2006-2009.
3. ทุนการศึกษาระดับปริญญาเอก จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ) กระทรวงศึกษาธิการ เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา ระยะเวลา พ.ศ.2549-2552 (Strategic Consortia for Capacity Building of University Faculties and Staff Scholarships Commission for Higher Education, 2006-2009)