

# 目錄

目錄.....	i
表次.....	iv
圖次.....	v
附錄圖次 .....	vi
中文摘要 .....	vii
英文摘要 .....	viii
中英對照縮寫表.....	x
第一章 緒言 .....	1
第二章 文獻回顧 .....	6
一、 突變育種有色米 .....	6
二、 水稻基因體與功能基因組研究.....	8
三、 醛脫氫酶家族 (Aldehyde dehydrogenase .....	10
superfamily, <i>ALDH</i> superfamily) .....	10
四、 植物 <i>ALDH</i> superfamily .....	12
五、 水稻 <i>ALDH</i> .....	14
六、 醛脫氫酶 7 ( <i>ALDH7</i> ) .....	15
七、 梅納反應 (Maillard reaction) .....	16
第三章 實驗架構 .....	19
一、 化學分析相關 .....	19
二、 分子生物相關 .....	20
第四章 材料與方法 .....	21
一、 試驗材料 .....	21

二、	試驗藥品 .....	25
三、	試驗方法 .....	26
(一)、	米粒一般成分測定 .....	26
(二)、	脂質過氧化測定 .....	28
(三)、	萃取黃米之黃色成分 .....	28
(四)、	揮發性成分分析 .....	34
(五)、	ALDH 在不同組織下之表現 .....	34
(六)、	水稻 ALDH 基因家族之分析 .....	37
第五章	結果 .....	38
一、	米粒一般成分測定 .....	38
二、	丙二醛含量分析 .....	40
三、	黃米與白米黃色成分比較 .....	42
四、	分子量分析 .....	47
五、	醣類分析 .....	51
六、	類黃酮萃取與測定 .....	54
七、	類胡蘿素萃取與測定 .....	54
八、	揮發性成分分析 .....	57
九、	ALDH 在不同組織下之表現 .....	57
十、	水稻 ALDH 基因家族之分析 .....	61
第六章	討論 .....	71
一、	滲透壓與脂質過氧化 .....	71
二、	黃色成分分析 .....	72
三、	分子量與醣類分析 .....	74
四、	揮發性成分分析 .....	75
五、	梅納反應產物 .....	76

六、	ALDH7 .....	77
七、	水稻基因家族 .....	78
第七章	結論 .....	79
第八章	參考文獻 .....	80
第九章	附錄 .....	88

## 表次

表一、成分分析與丙二醛含量測定所使用之材料、描述及代號 .....	22
表二、基因表現量分析使用之材料 .....	23
表三、針對 <i>Os09g26880</i> 設計之專一引子與 18s rRNA 之引子 .....	36
表四、米粒基本成分分析 .....	39
表五、丙二醛含量分析 .....	41
表六、凝膠過濾層析法之分子量分析表 .....	48
表七、M48 醣類組成分析表 .....	52
表八、水稻 <i>ALDH</i> 基因 locus ID、分子量、等電點與胺基酸數目 .....	62
表九、利用 BLAST 比對 AK119560 在水稻表現部位 .....	63
表十、利用 InterProScan 預測水稻 <i>ALDH</i> 基因可能 motif .....	66
表十一、MPSS 資料中未成熟米粒之 mRNA 表現 .....	68

## 圖次

圖一、AK119560 之染色體資料及突變位置 .....	3
圖二、使用材料之外觀 .....	24
圖三、利用水與甲醇溶劑萃取之萃取液顏色 .....	30
圖四、以全波長掃描分析萃取樣品之吸光值範圍 .....	43
圖五、使用薄膜層析法分析萃取樣品 .....	44
圖六、白米與黃米水萃取物之圖譜 .....	45
圖七、收集 HPLC 滯留時間 20 分鐘前之液體及每管於 360 nm 之吸光值 .....	46
圖八、以凝膠過濾層析法分析白米與黃米之差異波峰 .....	50
圖九、以高效率陰離子交換層析儀分析 M48 之醣類組成 .....	53
圖十、白米與黃米粉末之 70% 甲醇萃取物圖譜 .....	55
圖十一、白米與黃米粉末之乙醇萃取物圖譜 .....	56
圖十二、以逆轉錄聚合酶連鎖反應分析水稻授粉後不同天數 RNA 表現的相對量 .....	59
圖十三、以逆轉錄聚合酶連鎖反應分析水稻不同組織與處理 RNA 表現的相 ..	60
圖十四、白米與黃米以熱裂解方式再以 GC-MS 分析之結果 .....	69
圖十五、以 GC-MS 偵測出含量較高之化合物結構 .....	70

## 附錄圖次

附圖一、Hodge 學者建立之梅納反應模型 (Hodge 1953) .....	88
--	----

## 中文摘要

本試驗使用黃米（台農 76 號）為材料是以疊氮化鈉誘變台農 67 號所得之突變體，經連續八個世代的自交純化所得之穩定植株。本研究使用台農 67 號，以 RT-PCR 之方法，檢測 *OsALDH7* 基因於種子發育不同時期、不同部位以及各種逆境下之表現情形。另外並分析黃米之成分，使用去胚白米和去胚黃米，檢測基本成分與丙二醛含量，並嘗試找出黃色物質，以全波長掃描與薄膜層析法確定萃取物性質，以高效率液相層析儀和氣相層析質譜儀分析。

結果顯示，*OsALDH7* 基因於發育中之稻穗即大量表現，至水稻授粉後會有消長；鹽處理之表現量大於 ABA 處理。黃米之基本成分與白米相似，丙二醛含量黃米稍高於白米。以水、甲醇與乙醇萃取所獲得之樣品經過高效率液相層析儀發現並沒有類胡蘿蔔素，黃色物質為複合物且可能為類黃酮或梅納反應之產物。經由水萃取獲得之樣品通過 C18 管柱後，分出許多波峰且凍乾後為黃色。先經過酒精沉澱後分為上清液與沉澱，以凝膠過濾層析法分析黃色物質之分子量大小以及醣類組成，發現上清液之平均分子量約 1000，醣類組成為半乳糖、葡萄糖、甘露糖、肌醇、山梨醇與蔗糖；沉澱物之平均分子量約 3000，經酸水解之醣類分析為半乳糖、葡萄糖、甘露糖、肌醇、山梨醇與果糖。以 GC-MS 檢測白米與黃米成分後，發現黃色主要成分為糠醛、5-羥甲基-2-糠醛和 2-乙基羥基-4-羥基-5-甲基-3(2H)-咪喃酮。由於 *OsALDH7* 基因突變，造成黃色物質的產生。此黃色物質為複合物，為黃米於醣類或蛋白質代謝過程中產生之醛類物質，但 *OsALDH7* 已失去酵素功能，且醛類物質具有很高的活性，故會和鄰近物質反應，進行梅納反應，而產生多個具共價鍵的黃色物質。亦可能為類黃酮合成途徑中斷，形成的黃色中間代謝物。而此物質是否對人體有益，仍需再進一步的研究。

關鍵字：水稻、台農 76 號、高效率液相層析儀、逆轉錄聚合酶連鎖反應、類黃酮、醛脫氫酶。

## 英文摘要

The yellow rice Tainung 76 (TNG76) was generated mutant population using Tainung 67 (TNG67) by the mutagen sodium azide. One of the lines with yellow endosperm was pulled out. This line was recently designated TNG76, with a neck name "Yellow Rice". The specific aims of this study are to detect *OsALDH7* gene expression pattern in rice plants, to investigate the ingredients of the yellow rice grain, as well as to find out the yellow substances.

The RT-PCR experiments show that *OsALDH7* gene was highly expressed at developing panicles, while the transcript levels were fluctuated during seed filling stage. The expression was also high under salt-treated condition. The basic ingredient of yellow rice and TNG67 was quite similar. The content of malondialdehyde in yellow rice seeds was higher than that of the control seeds, TNG67. Ethanol or methanol extracts did not provide evidence for the presence of carotenoid using HPLC analysis. With the separation of C18 column, water extract of yellow rice gave many peaks. The dried samples from these peaks showed yellow to brown color. The samples were then separated into supernatant and pellet after ethanol precipitation, followed by molecular weight analysis and saccharide component assay. The molecular mean of the supernatant was about 1000, and it consisted of galactose, glucose, mannose, myo-inositol, sorbitol and sucrose. The molecular weight mean of pellet was about 3000, and it consisted of galactose, glucose, mannose, myo-inositol, sorbitol and fructose. The GC-MS analysis was also performed to reveal the major component of yellow substances.

The yellow color of TNG76 seeds was caused by the loss-of-function of the *OsALDH7* gene. The yellow substances were complex. Maillard reaction occurred in



the developing rice seeds, and aldehyde was one of the by-products. Aldehyde was not stable and was highly active, with the loss of *OsALDH7* function; aldehyde may react with nearby compounds. The final products thus consisted of chemicals with conjugated bonds and thus provided yellow color. The products also may be produced by stopping of flavonoid metabolism. It still required further analysis before we understood if those yellow substances were good for human health.

Key words : *Oryza sativa*, Tainung 76, HPLC, RT-PCR, flavonoid and aldehyde dehydrogenase.

## 中英對照縮寫表

英文	中文	縮寫
2-thiobarbituric acid	硫巴比妥酸	TBA
4-aminobutyric acid	$\gamma$ -氨基丁酸	GABA
abscisic acid	離層素	ABA
advanced glycation end product	最終醣化產物	AGEs
aldehyde dehydrogenase	醛脫氫酶	ALDH
antiquitin		AQ
betaine aldehyde dehydrogenase	甜菜鹼醛脫氫酶	BADH
ethyl methanesulfonate	甲磺酸乙酯	EMS
European cooperation in the field of Scientific and technical research	歐洲對話科技合作計畫	COST
gas chromatography mass spectrometry	氣相層析質譜儀	GC-MS
glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase	甘油醛 3-磷酸脫氫酶	GAPDH
heterocyclic aromatic amine	異環芳香胺類	HAA
high-performance anion-exchange chromatography	高效率陰離子交換層析法	HPAEC
high-performance liquid chromatography	高效能液相層析儀	HPLC
lipid peroxidation	脂質過氧化	LPO
maillard reaction	梅納反應	MR
maillard reaction products	梅納反應產物	MRPs
malondialdehyde	丙二醛	MDA
methanol	甲醇	MeOH
methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	丙二酸半醛脫氫酶	MMSDH
polyethylene glycols	聚乙二醇	PEG
retinaldehyde	視網醛	RA
retinoic acid	維生素 A 酸	RAC
size-exclusion chromatography	凝膠過濾層析法	SEC
sodium chloride	氯化鈉	NaCl
succinic semialdehyde dehydrogenase	琥珀酸半醛脫氫酶	SSADH
thin layer chromatography	薄膜層析法	TLC
trichloroacetic acid	三氯乙酸	TCA
trifluoroacetic acid	三氟醋酸	TFA
$\alpha$ -amino adipic semialdehyde	$\alpha$ -氨基己二酸半醛	AASA
$\Delta^1$ -pyroline-5-carboxylate dehydrogenase	1-吡咯啉-5-羧基脫氫酶	P5CDH
$\Delta^1$ -pyroline-5-carboxylate synthase	1-吡咯啉-5-羧基合成酶	P5CS

## 第一章 緒言

水稻 (*Oryza sativa*) 為一年生禾本科單子葉植物，為世界三大糧食作物之一。世界約有一半人口食用稻米，其主要栽種地在亞洲。稻米除了當成主食之外，經過加工可以做成米糕、米酒、米粉等加工製品，在亞洲各國文化生活中，佔有很重要的地位。近年來，由於人口急劇的增加，糧食缺乏的問題越來越嚴重；另外在已開發國家中，則有營養不均衡的問題，糧食產量的提升與機能性食品的開發成為水稻研究的趨勢。目前水稻之研究針對增加產量、提高營養成分、抵抗病蟲害與逆境等方向進行中。

Potrykus 和 Beyer 學者想以基因改良的方式，提高水稻種子  $\beta$ -胡蘿蔔素含量，以解救許多糧食缺乏國家的兒童，因為長期缺乏維生素 A，而罹患夜盲症等病症。他們先由水稻果實的胚乳中發現了 geranylgeranyl-pyrrophosphate，依據  $\beta$ -胡蘿蔔素生成路徑，只要再經過四個酵素作用，分別為 phytoene synthase、phytoene desaturase、 $\zeta$ -carotene desaturase 與 lycopene cyclase 酵素反應就可以生成  $\beta$ -胡蘿蔔素，Burkhardt 等學者將黃水仙花 (*Narcissus pseudonarcissus*) 的 phytoene synthase (*psy*) 基因轉殖入台北 309 號 (TP 309) 水稻中，使胚乳可以大量累積 phytoene (Burkhardt *et al.*, 1997)。Ye 等學者將土壤中歐文氏菌 (*Erwinia uredovora*) 的 phytoene desaturase (*crtl*) 基因與 *psy* 基因放入 pZPsC 載體中，稱為 pB19hpc。另一載體 pZLcyH 具有 lycopene  $\beta$ -cyclase (*lcy*) 基因與可以當作篩選基因---抗 Hygromycin 基因的 *aphIV*。將兩個質體放入農桿菌 (*Agrobacterium*) 中並感染水稻，讓水稻種子具有產生  $\beta$ -胡蘿蔔素的必須酵素，進而生成  $\beta$ -胡蘿蔔素，此為有名的基改黃金米 (Potrykus 2001; Ye

*et al.*, 2000)。

雖然已經成功的讓水稻種子具有  $\beta$ -胡蘿蔔素，但是對於消費者來說，基因改造生物 (genetically modified organism, GMO) 是一種新產品，雖然 GMO 有許多優點，包括減少農藥使用、增加食品營養價值與減少生產成本等優點，但是在食用上是否有健康或是改變環境生態等疑慮，故一般大眾並未完全接受。

大部份育種家採用傳統育種方法進行品種改良，傳統育種方法中，突變育種包括以輻射線照射等使其誘變之物理性方法、以化學試劑等處理誘變之化學性方法和以 T-DNA 等使其誘變之生物性方法。農試所王強生博士團隊以疊氮化鈉 (sodium azide,  $\text{NaN}_3$ ) 之化學性誘變法，誘發水稻台農 67 號突變，觀察後代表現並建立一個突變庫，包含約為 3000 個台農 67 號之突變體。於突變體中發現許多具有顏色之穀粒，稱為有色米 (施 2004)。有色米之色素主要分布於糊粉層與種皮，糊粉層為水稻種子胚乳之最外面一層細胞；種皮為糊粉層外之一層細胞。此米具有各種顏色，如黑色、黃色、橘色等，其顏色由花青素組成，花青素為多酚類之水溶性色素，且為類黃酮代謝之衍生物 (施 2004)。花青素會因羥基、糖基與甲基化的組成不同形成不同顏色，另外環境 pH 值和共色作用等也會影響顏色的呈現 (邱 & 范 1998)。

臺灣農業試驗所嘉義分所的吳永培博士在台農 67 號突變體之後代族群中找到黃色胚乳之品系，並命名為台農 76 號 (TNG 76) 黃米。不同於其他突變品系，黃米之黃色位於胚乳。吳永培博士認為此黃色成分可能為  $\alpha$ -

類胡蘿蔔素、 $\beta$ -類胡蘿蔔素與葉黃素等成分，對人體有益，且比起 GMO 水稻更受到消費者的信賴，沒有安全上的顧慮。然而天然黃色色素除了類胡蘿蔔素外，可能為類黃酮、單寧、betalain、醌類、xanthones、維生素 B<sub>2</sub> 等（張 1995）。以台農 76 號為材料，臺灣大學林彥蓉與中央研究院邢禹依博士利用染色體漫步的方法，發現第九條染色體核酸序列產生突變，而這突變的地方為醛脫氫酶（aldehyde dehydrogenase, ALDH）位於第 12 個 exon 的基因序列，造成由原先的精胺酸（arginine）改變成甘胺酸（glycine）（圖一）。針對此基因，我們曾擬進一步研究其在不同水稻生長時期、不同逆境、不同組織的表現，以及此基因位在細胞之位置。



圖一、AK119560 之染色體資料及突變位置

Figure 1. Chromosome and mutant location information of AK119560

Shin 等學者（2009），利用 T-DNA 隨機插入水稻基因之突變族群，找到破壞 ALDH 基因且為黃色種子的突變株。以水萃取米之黃色成分，發現吸光值於 360 nm 大量增加，故推測此黃色成分為梅納反應的產物。基因在

水稻授粉後表現量隨著天數增加而增高，於不同逆境下也會大量表現。利用綠色螢光蛋白接在此基因並轉殖於水稻原生質體觀察，發現它會在 cytoplasm 表現(Shin, et al., 2009)。將 *ALDH* 基因以大腸桿菌(*Escherichia coli*) 表現，發現此酵素之基質包括乙醛(acetaldehyde)、甘油醛(glyceraldehyde)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)並推測此基因可移除種子於乾燥下所產生之醛類物質，突變株之基因不表現，造成大量丙二醛等物質累積(Shin, et al., 2009)。

梅納反應為醣類、胺基酸和水所進行一連串的非酵素性反應，會產生揮發性物質、色素以及類黑精素等成分，於食品加工上，利用高溫處理使得梅納反應速率提高，藉以產生香氣和色澤(張 1995)。梅納反應在不同的 pH 值下會有不同的產物形成，而且產生之部分化合物不易消化，有些疑似具有毒性及突變性，或具有抗氧化的能力等等(Friedman 2005)。歐洲對話科技合作計畫(European cooperation in the field of Scientific and technical research, COST)針對梅納反應之產物與類黑精素進行調查，發現它們對於腸道細菌具有促進生長的功用、預防疾病的潛力、抗氧化的能力、抗基因毒性、抗誘變劑以及影響糖化作用(Somoza 2005)。

此外，貯存過久之陳米亦會造成米粒發黃，於貯存過程中，造成各種化學反應，其中脂質過氧化會經由分子內環化、裂解等產生 MDA 等物質(張 1995)。與 Shin 等學者針對 *ALDH* 基因所推測之基質相同(Shin, et al., 2009; 張 1995)。

本研究之目的為檢測 TNG 76 號黃米，包括其基本成分與育種之親本白

米和陳米之差異。針對脂質過氧化之產物（丙二醛），以 TBA 法測定其含量以檢測正常之精白米、陳米間之差異。以水、甲醇、乙醇等溶劑萃取，針對有益人體之健康成分且為黃色之物質包括類黃酮以及類胡蘿蔔素，比較黃米與白米間之差異。另外針對黃米相對於白米差異的波峰，分析其分子量大小及組成，以推測參與梅納反應之主要化合物及其聚合情形。並以氣相層析質譜儀分析黃米與白米之揮發性成分，從資料庫比對找出可能之結構。另外以分子生物研究方法，利用逆轉錄聚合酶連鎖反應觀察 *ALDH* 基因在正常白米授粉後不同的天數、不同的組織和不同的逆境下表現。

## 第二章 文獻回顧

### 一、突變育種有色米

突變育種為改變水稻核酸序列方式之一，包括物理性誘變、化學性誘變以及生物性誘變 (Fehr 1987)。物理性誘變常見的有 X-rays、 $\gamma$ -rays 和 UV 輻射等方法，大部分是使染色體大片段改變；化學性誘變常見的有疊氮化鈉、甲磺酸乙酯 (ethyl methanesulfonate, EMS) 等；疊氮化鈉與 EMS 可以造成序列上的單點突變 (Fehr 1987)。生物性誘變包括 T-DNA 誘變與跳躍子誘變 (Tos17)，作用方式為插入新的序列，使基因表現改變，包括活化與剔除 (Fehr 1987)。

疊氮化鈉屬於化學突變劑，處理於生物體可使其突變產生各式之變異。臺灣農業試驗所研究員以疊氮化鈉處理於台農 67 號為材料，觀察處理後之變化並建立水稻台農 67 號之突變資料庫，其中有些突變品系之糊粉層與種皮具有顏色，如黑色、黃色、橘色等，稱為有色米，其顏色由花青素組成 (施 2004)。花青素為廣泛存在於植物中之水溶性色素，位於液泡，於不同 pH 值下，顏色具有無色、紅色以及藍色，花青素由花青素配質和不同數目的糖分子結合而成，造成花和水果等不同顏色 (張 1995)。其中紅色為芍藥素 (peonidin)，紫色為矮牽牛素 (petunidin)，藍紫色為飛燕草素 (delphinidin)，紫紅色為矢車菊素 (cyanidin)，橘紅色為天竺葵素 (pelargonidin)。

有色米產生花青素之原因，可能於花青素合成途徑上，酵素因為疊氮化鈉之處理，喪失正常功能，使中間產物累積，產生顏色 (Reddy *et al.*, 1995)。此外也選育到水稻種子之直鏈性與支鏈性澱粉比例改變之品系，直鏈性澱粉



較多會影響米粒之柔軟度、色澤與光澤下降（鄭 2005）。

天然之色素除花青素外，亦有類黃酮素、單寧、betalains、醌類、xanthonnes 以及類胡蘿蔔素等（張 1995）。類黃酮素之化學構造與花青素類似，大部份為水溶性之黃色色素（張 1995）。類黃酮種類中，以黃酮醇種類最多，另外也包括黃酮、查耳酮與雙黃酮等，類黃酮也會以配醣體的形式存在於植物（張 1995）。單寧為混和物，分為縮和單寧與可水解單寧，水溶性且顏色自無色至黃色，其中 theaflavin gallate 可能為茶葉發酵之中間產物（張 1995）。Betainns 為水溶性之暗紅色色素，具有含氮之環狀結構，於果實和花中可以發現（張 1995）。醌類與 xanthonnes 皆為水溶性之黃色色素，但醌類之顏色由淡黃至黑色，於開花植物、黴菌、藻類等皆可發現（張 1995）。Xanthonnes 為黃色色素之總稱，其中 mangiferin 以配醣體形式存在於芒果（張 1995）。類胡蘿蔔素為油溶性，顏色由黃至紅，存在於動物、藻類和番茄等（張 1995）。

## 二、 水稻基因體與功能基因組研究

西元 1998 年，國際水稻基因組定序計畫（International Rice Genome Sequencing Project, IRGSP）以粳稻品種日本晴（Nipponbare）為材料，集合日本、美國、中國、臺灣、法國和印度等十個國家團隊合作，其中獨立完成整條染色體的國家有日本、美國、中國、臺灣、法國，其中日本負責解碼第 1、2、6、7、8 和 9 條染色體；美國負責解碼第 3、10 和 11 條染色體；中國負責解碼第 4 條染色體；臺灣負責解碼第 5 條染色體；法國負責解碼第 12 條以及第 11 條部分染色體。2004 年 IRGSP 宣布完成水稻基因體之序列 99% 解碼（IRGSP 2005）。其重要性在於水稻為目前已知的禾本科作物中基因體是最小的（約 390Mb），且其基因在染色體上的排列與其他禾本科作物非常類似，所以成為禾本科模式植物（IRGSP 2005）。吾人可藉此了解控制性狀基因之外，還可以精確的知道此基因位於染色體上的位置。

水稻基因體定序完成，接下來為功能性基因組之研究，以核酸序列為基礎，以分子生物與遺傳方法證明各個基因之功能，包括了使基因 block、基因活化、基因靜默等方法。此外需要特定序列做為標定，以確定插入之染色體位置，T-DNA、*Tos17* 與 *Ac/Ds* 常被當作標定系統（Hsing *et al.*, 2007）。利用 T-DNA 隨機插入序列中，將基因活化或 block，將此突變品系與正常植株比較差異情形，以了解突變基因具有之功能。使用 T-DNA 之優點為基因體中平均 1–2 拷貝，且穩定，不容易發生插入多個基因的情形（An *et al.*, 2005）。臺灣、法國、南韓與中國學者皆以 T-DNA 的方法研究水稻之功能性基因組（Chen *et al.*, 2003；Hsing, *et al.*, 2007；Jeong *et al.*, 2006；Sallaud *et al.*, 2004）。臺灣學者 Hsing 等（2007）利用 T-DNA 隨機轉殖入台農 67 號水稻，使其產生突變並保留突變性狀藉以建立突變品系資料庫，

現今已有 55000 個突變品系，稱為 TRIM (Taiwan Rice Insertion Mutants) (<http://trim.sinica.edu.tw/>)。Gibberellin 2-oxidase (GA2ox) 基因經由 T-DNA 活化後，會導致原為正常高度之植物突變為矮株，由上述可知 GA2ox 可以調控植物對於 GA 之反應 (Hsing, *et al.*, 2007)。

*Tos17* 為反轉錄轉位子，它會於植物體中自行拷貝與插入，block 基因。首先 DNA 轉錄成數個 RNA，再反轉錄為 cDNA，隨機插入基因，其拷貝數目非常多(Boeke *et al.*, 1985)。使用 *Tos17* 之優點為插入基因之機率較高，但是卻有同時插入數個基因的可能，此方法為日本學者所應用 (Hirochika 1997)。日本學者 Miyao 等 (2003) 以 *Tos17* 誘發產生突變之突變體並保留突變性狀所建立之資料庫，目前已有 4 萬多個品系。*OSH15* 基因與頂端分生組織有關，當 *OSH15* 被 *Tos17* 插入時，會使水稻植株變矮，表皮細胞形狀變異，維管束組織變小且呈現不規則排列 (Sato *et al.*, 1999)。

*Ac/Ds* 為一種轉移因子系統，最早為 Barbara McClintock 學者於玉米中發現 (Fedoroff *et al.*, 1983)。*Ac* 與 *Ds* 皆為轉位子，不同的是 *Ac* 具有轉移酵素之基因可自行轉位，而 *Ds* 因為缺少轉位基因，需要 *Ac* 存在才能轉位(Izawa *et al.*, 1997)。*Ac/Ds* 會剔除基因，使用 *Ac/Ds* 之優缺點與 *Tos17* 相同，此方法為澳洲學者等所應用(Kolesnik *et al.*, 2004)。*Jiang* 等(2007) 以 *Ac/Ds* 系統誘發突變並建立了一個突變品系資料庫，觀察此突變品系種子之顯性性狀以及自然逆境下，不同品系之產量和對抗逆境等情形。發現一個 pentatricopeptide repeat- containing protein 之基因(LOC\_Os07g36450) 被 *Ds* 插入後，產量會增加 (Jiang, *et al.*, 2007)。

### 三、 醛脫氫酶家族 (Aldehyde dehydrogenase superfamily, *ALDH* superfamily)

*ALDH* 基因家族是由一個古老的 *ALDH* 基因所演化而來的，至今在資料庫中已有生物間發現超過 555 個 *ALDH* 基因 (Sophos and Vasiliou 2003)。經由胺基酸序列分析，可以區分為 21 個家族：*ALDH1*、*ALDH2* 到 *ALDH21*，其中 *ALDH11*、*ALDH19* 和 *ALDH21* 只有存在於植物中 (Gao and Han 2009)。

*ALDH* 屬同功異構酶 (isozyme)，共有七種酵素：(一) 半醛脫氫酶 (semialdehyde dehydrogenase)，包含麩醯胺半醛脫氫酶 (E.C. 1.2.1.41)、琥珀酸半醛脫氫酶 (succinic semialdehyde dehydrogenase, SSADH) (E.C. 1.2.1.24) 和 甲基丙二酸半醛脫氫酶 (E.C. 1.2.1.27) 等；(二) 非專一性醛脫氫酶 (non-specific aldehyde dehydrogenase) (E.C. 1.2.1.3)；(三) 甜菜鹼脫氫酶 (betaine dehydrogenase) (E.C. 1.2.1.8)；(四) 未磷酸化甘油醛 3-磷酸脫氫酶 (non-phosphorylating glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) (E.C. 1.2.1.9)；(五) 苯乙醛脫氫酶 (phenylacetaldehyde dehydrogenase) (E.C. 1.2.1.39)；(六) 丙醛脫氫酶 (propionaldehyde dehydrogenase) (E.C. 1.2.1.22)；(七) 類醛脫氫蛋白 (ALDH-like protein)，其中類醛脫氫蛋白是在胺基酸序列上與醛脫氫酶非常相似的蛋白 (Vasiliou *et al.*, 2000)。

從 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) 與 ExPASy (Expert Protein Analysis System, <http://www.expasy.org/>) 的 PROSITE 指出 *ALDH* family 有兩個共同序列 (consensus sequence)，分別是麩醯酸

保留位置 (Glu conserved site) (PS00687) 和半胱氨酸保留位置 (Cys conserved site) (PS00070)。ALDH 在含有 NAD(P)<sup>+</sup> 的環境下具將脂肪族醛類 (aliphatic aldehydes) 與芳香族醛類 (aromatic aldehydes) 氧化為酸，並將 NAD(P)<sup>+</sup> 還原為 NAD(P)H (Vasiliou *et al.*, 2004)。它被認為具有以下幾種功能：解毒作用、參與代謝路徑、保護植物被滲透壓傷害與產生 NAD(P)H (Fong *et al.*, 2006)。醛類的產生主要有內部與外部因素，內部因素為生物體代謝過程，如醣類代謝、蛋白質代謝等產生之醛類 (Schauenstein *et al.*, 1977 ; Vasiliou and Nebert 2005 ; Yoshida *et al.*, 1998)。外部因素則為環境或藥物所引起的生物轉化而產生醛類，其帶有電子與體內含有硫烴基或胺基物質進行親核性反應，進而影響代謝系統，對生物的影響包括生理調控、細胞毒性及致癌性等 (Lindahl 1992)。

#### 四、植物 *ALDH* superfamily

目前在植物中發現的 *ALDH* 基因只有少數被證實具有功能，且主要在高鹽濃度以及缺水的逆境下表現，故酵素可抵抗膨壓 (Kirch *et al.*, 2004 ; Kirch *et al.*, 2005)。另外，使植物 *ALDH* 基因表現可提高抵抗逆境環境的能力 (Huang *et al.*, 2008 ; Kotchoni *et al.*, 2006 ; Rodrigues *et al.*, 2006)。水稻在浸水後恢復通氣時，*ALDH2a* 可將乙醛 (acetaldehyde) 氧化 (Tsuji *et al.*, 2003)。於阿拉伯芥，*ALDH2C4* 會影響阿魏酸 (ferulic acid) 和芥子酸 (sinapic acid) 之生合成 (Nair *et al.*, 2004)。

阿拉伯芥 *ALDH* 基因目前分為九個家族：*ALDH2*、*ALDH3*、*ALDH5*、*ALDH6*、*ALDH7*、*ALDH10*、*ALDH11*、*ALDH12*、*ALDH22* (Kirch, *et al.*, 2004)。*ALDH2* 以同源四聚體呈現及位於粒線體或細胞液 (Skibbe *et al.*, 2002)。*rf2* 為最早被發現之 *ALDH2*，可修復細胞質雄不稔 (Liu *et al.*, 2001)。*ALDH3* 以同源二聚體呈現及位於微粒體或細胞液 (Kirch, *et al.*, 2004 ; Kirch *et al.*, 2001)。最早發現 *ALDH3* 存在於復甦植物 (*Craterostigma plantagineum*)，可以抵抗離層素 (abscisic acid, ABA) 逆境 (Kirch, *et al.*, 2001)；由酵素動力學資料顯示，此酵素可能在脂質過氧化中氧化醛類。*ALDH5* 和 *ALDH6* 為 *SSADH* (succinic semialdehyde dehydrogenase) 酵素。植物之 *SSADH* (succinic semialdehyde dehydrogenase) 突變，會造成過氧化氫 ( $H_2O_2$ ) 累積，故 *SSADH* (succinic semialdehyde dehydrogenase) 被推測可抵抗環境逆境。*ALDH7*、*10*、*11* 和 *12* 在滲透壓逆境時會大量表現；*ALDH7* 表現於高膨壓、缺水以及低溫等逆境 (Kirch, *et al.*, 2004)。*ALDH10* 為甜菜鹼醛脫氫酶，表現於缺水以及高鹽逆境，其功能為催化甜菜鹼醛氧化為甜菜鹼 (Weretilnyk and Hanson 1990)。*ALDH11* 只

有 *ALDH11A3*，為非磷酸化之甘油醛 3-磷酸脫氫酶 (glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)，參與糖解作用 (Kirch, *et al.*, 2004)。*ALDH12* 只有 *ALDH12A1*，為 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase，位於粒線體可將脯氨酸 (proline) 降解為麩氨酸 (glutamate) (Hare and Cress 1997)。*ALDH22* 異於其他 *ALDH*，在滲透壓逆境下表現量不會改變，仍維持低表現 (Kirch, *et al.*, 2005)。

## 五、 水稻 ALDH

水稻 *ALDH* 基因有 20 個基因，分為 10 個家族，其中 *ALDH2*、*ALDH3*、*ALDH10* 和 *ALDH18* 有許多基因組成，而 *ALDH5*、*ALDH6*、*ALDH7*、*ALDH11*、*ALDH12* 和 *ALDH22* 僅只一個基因 (Gao and Han 2009)。基因表現的部位，在莖桿表現的包括 *OsALDH2-3*、*OsALDH2-4*、*OsALDH3-3*、*OsALDH3-4* 和 *OsALDH18-1*。於花有表現的包括 *OsALDH 2-1*、*OsALDH2-3*、*OsALDH3-3*、*OsALDH 3-5*、*OsALDH 10-1*、*OsALDH 10-2*、*OsALDH 11*、*OsALDH 12* 和 *OsALDH18-1*。於年輕之根表現的包括 *OsALDH2-1*、*OsALDH 2-1*、*OsALDH 2-5*、*OsALDH 6*、*OsALDH 7*、*OsALDH10-1*、*OsALDH10-2*。於年輕之葉子表現的包括 *OsALDH3-1*、*OsALDH3-4*、*OsALDH11* (Gao and Han 2009)。

水稻於秧苗與生殖時期，環境因子更易造成傷害 (Lutts *et al.*, 1995)。生殖時期以乾燥處理，葉片之基因包括 *OsALDH7*、*OsALDH18-1* 和 *OsALDH18-2* 表現提高，但 *OsALDH3-1* 表現降低；以 ABA 處理，*OsALDH2-4*、*OsALDH3-4*、*OsALDH7*、*OsALDH10-1* 和 *OsALDH18-1* 之基因表現量提高 (Gao and Han 2009)。



## 六、 醛脫氫酶 7 (ALDH7)

ALDH7 家族又稱為 antiquitin (AQ)，與其他 ALDH family 的胺基酸序列僅 30%相似。ALDH7 分為三個群組；ALDH7A、ALDH7B 和 ALDH7C，分別代表發現於動物、植物以及果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 之基因 (Fong *et al.*, 2006)。ALDH7 可抵抗缺水所造成的膨壓與其他逆境，為了對抗缺水逆境，其中之一的的方法是產生滲透壓保護劑 (osmoprotectant) (Burg *et al.*, 1996)。滲透壓保護劑由小分子組成，可累積在細胞內保護細胞 (Chen and Murata 2002)。最早在缺水的豌豆中發現 ALDH7 會大量表現 (Guerrero *et al.*, 1990)。阿拉伯芥之 ALDH7B4 在乾燥、高鹽和 ABA 逆境下會大量表現於植株；而乾燥與 ABA 逆境下可誘導根部表現 (Kirch, *et al.*, 2005)。Buchanan 等 (2005) 利用微陣列技術 (microarray) 找到一個 ALDH 基因，在聚乙二醇 (polyethylene glycols, PEG)、ABA 和高鹽逆境下，根部會有顯著表現，而幼苗則顯著表現於 PEG 和 ABA 逆境。大豆之 AQ (GmTP55) 為在缺水逆境之種子表現之基因，將此基因轉殖至阿拉伯芥和菸草中，其植株不僅可抵抗缺水逆境，亦可與醛類反應、抵抗乾燥和高鹽逆境以及減少脂質過氧化的進行 (Rodrigues, *et al.*, 2006)。水稻之 AQ 會在缺水、高鹽、冷、熱以及農藥 (巴拉刈) 之逆境下表現，授粉後隨著天數增加表現量增高；此酵素對於 MDA、acetaldehyde 與 glyceraldehyde 有活性，推測水稻之 AQ 功能為去除種子在乾燥下所產生之多種醛類 (Shin, *et al.*, 2009)。動物與微生物亦有 AQ，最早在公牛的胃發現 AQ (Hsu *et al.*, 1994)。序列比對的結果得到人類與植物之 AQ 相似程度非常高，故人類之 AQ 可能與植物 AQ 具有相同功能，如調節滲透壓與解毒作用 (Fong, *et al.*, 2006；Yoshida, *et al.*, 1998)。

## 七、梅納反應 (Maillard reaction)

梅納反應在食品加工上扮演很重要的角色，為一種非酵素性褐變反應，包含了咖啡的烘培、麵包的烘烤以及肉製品的加工等，可影響食品的香氣、口感以及顏色且溫度愈高，反應速率越快(張 1995)。Hodge 學者(1953)建立了梅納反應的模型，早期由胺基酸提供胺基與還原糖提供羰基進行縮合反應形成 N-substituted glycosilamine，其中胺基酸為離胺酸較多，而糖類則為醛糖以及酮糖(附圖一)。縮合反應後接著再進行 Amadori rearrangement 形成 1-amine-1-deoxy-2-ketose(1-胺基-1-去氧-2-己酮糖)；pH 值會影響中期反應的進行，當 pH 值小於等於 7 時，主要進行 1,2-enolisation(1,2-烯醇化)，形成 furfural(糠醛)與 hydroxymethylfurfural(羥甲基糠醛)。pH 值大於 7，則進行 2,3-enolisation(2,3-烯醇化)形成還原酮以及多種裂解之化合物如丙酮醇、二乙醯基等產物；其中雙碳化合物會與胺基酸進行 Strecker degradation，形成醛和  $\alpha$ -酮胺；後期進行一連串反應，如環化、重排、脫水等，最終形成類黑精素(melanoidin)(Martins *et al.*, 2000)。類黑精素為梅納反應(maillard reaction, MR)在高溫下的產物，顏色為褐色，以不同分子聚合呈現。

人體食入類黑精素及其他梅納反應產物(maillard reaction products, MRPs)，部分會被吸收有些則否。以同位素標定於分子，檢測排泄物、尿和呼吸的氣體可得吸收和未被吸收的量，如將氮-15 標定在甘胺酸(glycine)上，並與葡萄糖反應形成高分子量的類黑精素，將其餵食於大鼠，確定其吸收和未吸收的比例(Homma and Fujimaki 1981)。另以碳-14 標定於葡萄糖，與酪蛋白結合成高分子與低分子量之類黑精素，餵食於大鼠，測試其吸收率亦檢測了高分子(大於 10KD)與低分子(小於 10KD)對於吸收率之影響

(Finot and Magneat 1981)。未被人體吸收的部份，部分會被腸道微生物分解吸收 (Ames *et al.*, 1999)，有些則與異環芳香胺類 (heterocyclic aromatic amine, HAA) 結合，降低 HAA 吸收的比率，由於並不了解類黑精素結構，故無法建立吸收過程 (Somoza 2005)。人體對低分子量的吸收率較高，吸收之類黑精素會與體內的胺基酸結合，使蛋白質喪失活性 (Lee and Chichester 1983)。由於類黑精素為外來物，此類物質可引起解毒酵素作用，故具有作為預防疾病之潛力，另外推測高分子量之類黑精素可被腸道微生物分解為低分子量而被腸道吸收，未被吸收之類黑精素則可與 HAA 等有害物質結合，減少對人體之傷害 (Wilkinson and Clapper 1997)。

食物在高溫加工時，食物內的游離胺基酸、單醣和肌酸酐 (creatinine) 行合成反應而產生類黑精素、HAA 與丙烯醯胺 (acrylamide) 等產物，其中 HAA 與丙烯醯胺可傷害人體 (Granvogl *et al.*, 2004；Skog *et al.*, 1998)。利用醣類與酪蛋白合成的類黑精素，對沙門氏菌做安姆氏試驗 (Ames test)，發現可促進突變，且不同之醣類形成之類黑精素之促進突變能力亦不同 (Brands *et al.*, 2000)。以 glycine-glucose 合成的類黑精素並無促進突變效果 (Taylor *et al.*, 2004)。雖然已知部份類黑精素之功能，但目前尚未明瞭類黑精素於人體之吸收、代謝以及是否有突變之功能。

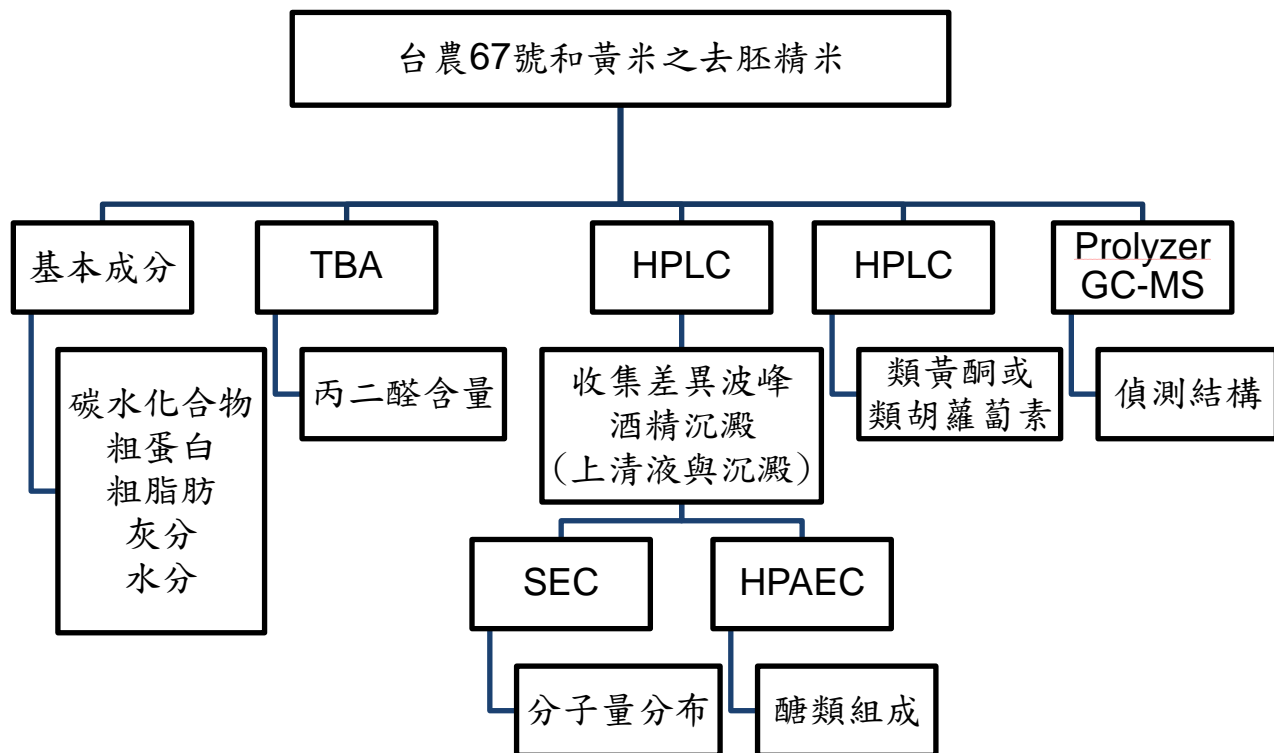
人體內為了平衡葡萄糖的濃度，體內的 MRPs 會進行一連串的反应形成最終醣化產物 (advanced glycation end product, AGEs)，經由 AGEs 修飾之蛋白質為糖尿病與老化發病之關鍵物質 (Forbes *et al.*, 2003)。糖尿病患者吸收 MRPs 後，會促進發炎反應之傳遞分子形成，導致組織發炎 (Vlassara *et al.*, 2002)。然而對於健康的人是否會造成發炎反應以及吸收後 MRPs 的

結構，需要進一步的研究 (Somoza 2005)。

### 第三章 實驗架構

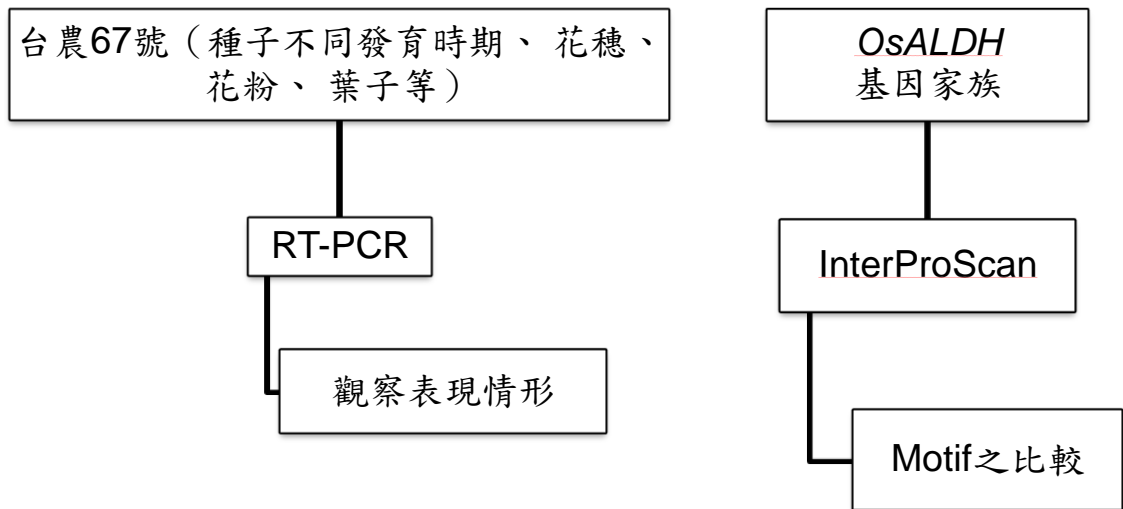
#### 一、化學分析相關

以台農 67 號與黃米之去胚精米為材料，比較兩樣品間基本成分之差異。以 TBA 方法來偵測丙二醛的含量。以水萃取黃色物質，並以 HPLC 分離出差異之波峰，收集此波峰凍乾後，以酒精沉澱分離游離醣及多醣，並經由 SEC 以及 HPAEC 分析分子量與醣類組成。兩樣品以 70% 甲醇萃取類黃酮成分，以乙醇萃取類胡蘿蔔素成分，分別以 HPLC 分析其中是否具有類黃酮及類胡蘿蔔素。取兩樣品粉末，以熱裂解儀串聯 GC-MS 之方式偵測結構。架構如下：



## 二、分子生物相關

以台農 67 號種子不同發育時期、不同組織以及不同逆境之材料，以逆轉錄聚合酶連鎖反應分析 *OsALDH7* 基因之表現情形。另外根據 Gao 和 Han 學者 (2009) 找到之水稻 *ALDH* 基因，針對胺基酸序列，以 InterProScan 分析各個基因之 Motif 以期望了解可能之功能。架構如下：



## 第四章 材料與方法

### 一、試驗材料

本試驗於基本成分分析之材料為 2007 年貯存之白米（台農 67 號）、黃米（台農 76 號）、香米（台農 71 號）和陳米（表一）。丙二醛含量測定之材料為 2004 至 2008 年貯存之白米、黃米、香米及陳米（表一）。萃取部份之材料為 2007 年貯存之白米與黃米（表一）。分子生物分析部分，由中央研究院試驗田採集台農 67 號之癒傷組織、根部、新鮮葉子、花粉、穗、種子及以 20  $\mu\text{M}$  離層素 (abscisic acid, ABA) 和 150  $\mu\text{M}$  氯化鈉 (sodium chloride, NaCl) 處理之新鮮葉子（表二）。黃米為吳永培博士提供，各年份之白米、香米及陳米由臺灣農業試驗所賴明信博士提供。（圖二）為 2007 年貯存之白米、黃米與陳米之精米外觀。

表一、成分分析與丙二醛含量測定所使用之材料、描述及代號

**Table 1.** Materials, description and code for component and malondialdehyde quantity analysis

主材料	材料部位	描述	代號
黃米	胚乳	2008 年開始貯存之去胚精米	YR
白米	胚乳	2004 年開始貯存之去胚精米	04TN67
	胚乳	2005 年開始貯存之去胚精米	05TN67
	胚乳	2006 年開始貯存之去胚精米	06TN67
	胚乳	2007 年開始貯存之去胚精米	07TN67
香米	胚乳	2003 年開始貯存之去胚精米	03TN71
陳米	胚乳	2007 年開始貯存之去胚精米	07S

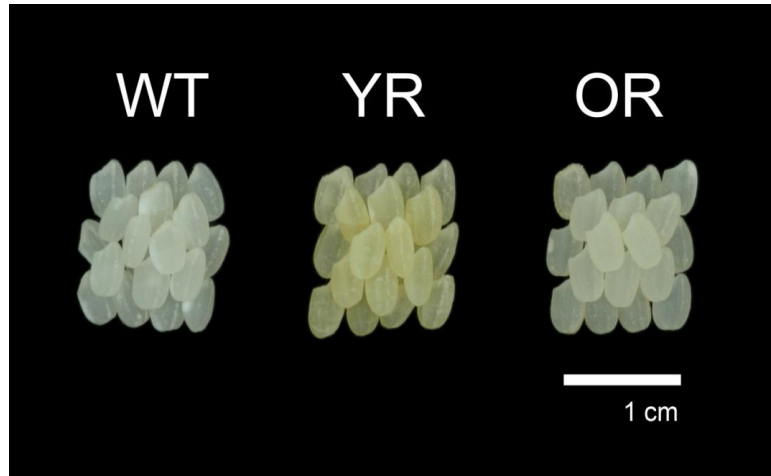


表二、基因表現量分析使用之材料

**Table 2** Material, descriptions and code for gene expression analysis

材料部位	描述	代號
新鮮葉子	生長 14 天之葉片	NYL
根部	生長 14 天之根部	NYR
癒傷組織	生長 35 天之癒傷組織	NCA
鹽處理葉子	經 150 $\mu$ M NaCl 處理 14 天之葉子	NSL
離層素處理葉子	經 20 $\mu$ M ABA 處理 14 天之葉子	NAL
穗	3cm 之幼穗	P3
	8cm 之幼穗	P8
	13cm 之幼穗	P13
	20cm 之穗	P20
	28cm 之穗	P28
花粉	田間自然爆開之成熟花粉	PF
	經過高濕度處理之成熟花粉	PHW
	經過高濕度和白熱燈處理之成熟花粉	PWL
種子	開花後 1~3 天之胚與胚乳	G1
	開花後 4~6 天之胚與胚乳	G2
	開花後 7~9 天之胚與胚乳	G3
	開花後 10~13 天之種子胚乳	Em4
	開花後 10~13 天之種子的胚	Eb4
	開花後 14~16 天之種子胚乳	Em5
	開花後 14~16 天之種子的胚	Eb5
	開花後 17~19 天之種子胚乳	Em6
開花後 17~19 天之種子的胚	Eb6	
種子	開花後 20~22 天之種子胚乳	Em7
	開花後 20~22 天之種子的胚	Eb7
種子	開花後 23~25 天之種子胚乳	Em8
	開花後 23~25 天之種子的胚	Eb8

\*使用品種為台農 67 號



圖二、使用材料之外觀

三種樣品皆為精米，WT：白米；YR：黃米；OR：陳米。

**Figure 2.** The polished grains used in the study

All of three grains were WT: wild type; YR: yellow rice; OR: old rice.

## 二、 試驗藥品

硫巴比妥酸	2-thiobarbituric acid	Sigma, 美國
沸石	Boiling stone	林純藥株式會社, 日本
硼酸	Boric acid	島九藥品株式會社, 日本
氯仿	Chloroform	Merck, 德國
乙醇	Ethanol	Merck, 德國
甲酸	Formic acid	Merck, 德國
鹽酸	Hydrochloric acid	聯工, 臺灣
甲醇	Methanol	Merck, 德國
石油醚	Petroleum	島九藥品株式會社, 日本
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	聯工, 臺灣
硫酸	Sulfuric acid	聯工, 臺灣
三氯乙酸	Trichloroacetic acid	Sigma, 美國
三氟醋酸	Trifluoroacetic acid	Merck, 德國
TRI REAGENT		Sigma, 美國

### 三、 試驗方法

#### (一)、 米粒一般成分測定

##### 1 粗蛋白之測定

參考 AOAC (1985) 之凱氏氮分析 (Kjeldahl method)，分析樣品粗蛋白含量。分別秤黃米 (YR)、台農 67 (07TN67)、台農 71 (03TN71) 和陳米 (07S) 各 1 g，加入 20 mL 濃硫酸與消化碇並利用凱氏氮分解裝置(BÜCHI, Digestion Unit K-435, Switzerland)將蛋白質分解，蛋白質中的氮會與硫酸反應成硫酸氮 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，再經過蒸餾，使氮游離並與硼酸反應形成四硼酸胺((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>)，接著使用 BG-MR 指示劑與 0.1 N 鹽酸滴定，以確定粗蛋白之含量。各測定重複三次，其結果以 SAS system version 9.0 分析 (SAS Institute Inc, U.S.A.)。

粗蛋白之計算公式：

粗蛋白含量 =

$$\frac{[\text{樣品消耗之鹽酸 (mL)} - \text{空白組消耗之鹽酸 (mL)}] \times 0.0014 \times 6.25 (\text{含氮係數})}{\text{樣品重量(g)}} \times 100\%$$

##### 2 粗脂肪之測定

參考 AOAC (1984)，以石油醚萃取油脂後，將石油醚揮發，得到粗脂肪含量。分別秤 YR、07TN67、03TN71 和 07S 各 2 g 樣品於秤量紙上將其包住並放置於圓筒濾紙內以脫脂棉蓋好，萃取杯內加入 3 顆沸石，放於烘箱 100°C 2 小時。取出移至乾燥器，將乾燥器蓋子打開冷卻 5 分鐘，關起蓋子乾燥 30 分鐘，測量萃取杯乾重量，測量完成後放回乾燥器中。利用快速油脂測定儀 (Soxtec system HT6 extraction unit 1043, service unit 1046, Sweden)；以石油醚萃取油脂並流入萃取杯中，將萃取杯放於加熱板上加熱，使石油醚揮發，接著放於乾燥器 30 分鐘，秤量萃取杯之重量。樣品重複三次，測定結果以 SAS system

version 9.0 分析 ( SAS Institute Inc, U.S.A. )。

粗脂肪計算公式：

$$\text{粗脂肪含量} = \frac{\text{萃取後萃取杯之重量(g)} - \text{萃取杯之乾重(g)}}{\text{樣品重量(g)}} \times 100\%$$

### 3 灰分之測定

參考 AOAC (1991)，將坩鍋放置於 10 % 稀鹽酸，加熱煮沸 2 小時。冷卻取出後以去離子水清洗，放入烘箱中烘乾，將乾燥之坩鍋置於灰化爐 (525°C) 8 小時。靜置 12 小時後取出移置乾燥器冷卻，紀錄坩鍋乾重。秤 YR、07TN67、03TN71 和 07S 各 5 g 樣品放入坩鍋。利用灰化爐將樣品完全灰化，冷卻至 100°C 左右，將坩鍋放置乾燥器內 30 分鐘後，秤其灰化後總重。樣品重複三次，測定結果以 SAS system version 9.0 分析 ( SAS Institute Inc, U.S.A. )。

灰分計算公式：

$$\text{灰分含量} = \frac{\text{灰化後總重(g)} - \text{坩鍋乾重(g)}}{\text{樣品重量(g)}} \times 100\%$$

### 4 水分之測定

參考 AOAC(1991)，先將秤量皿烘乾秤乾重，分別秤 YR、07TN67、03TN71 和 07S 各 10 g 樣品。經由減壓乾燥法將水分去除，經過反覆秤量至恆重，紀錄其重量。樣品重複三次，測定結果以 SAS system version 9.0 分析 ( SAS Institute Inc, U.S.A. )。

水分計算公式：

$$\text{水分含量} = \frac{[\text{秤量皿乾重(g)} + \text{樣品重量(g)}] - \text{乾燥後之重量(g)}}{\text{樣品重量(g)}} \times 100\%$$

## (二)、脂質過氧化測定

參考 Heath 與 Packer 學者 (1968) 方法，以硫巴比妥酸 (2-thiobarbituric acid, TBA) 法測定脂質氧化後裂解之產物 MDA 含量，代表脂質過氧化之程度 (Heath and Packer 1968)。取約 100 mg 之黃米(YR)、白米(04TN67、05TN67、06TN67、07TN67)、香米 (03TN71) 和陳米 (07S) (樣品詳細資料、代號列於(表一))，紀錄樣品重。加入 2 mL 之 5% 三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)，震盪 10 分鐘，接著於 20°C 離心 4000 g 20 分鐘，取 1 mL 之上清液於新的微量離心管中，加入 4 mL 之 0.5% TBA (溶於 20% 之 TCA)，於 95°C 下反應 30 分鐘。將離心管插入冰裡 20 分鐘以中止其反應，接著於 4°C 離心 4000 g 15 分鐘，取上清液測定波長為 532 nm 和 600 nm 之吸光值。取 200  $\mu$ L 之 5% TCA 代替樣品上清液當作空白試驗。樣品重複三次，測定結果以 SAS system version 9.0 分析 (SAS Institute Inc, U.S.A.)。

MDA 計算方法：

$$\text{MDA 含量 (nmol/g)} = \frac{(\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}) \times 1 (\text{反應體積}) \times 4 (\text{稀釋倍數}) \times 1000}{\text{樣品重量(g)} \times 155 (\text{K, mM}^{-1} \text{cm}^{-1})}$$

## (三)、萃取黃米之黃色成分

### 1 水萃取之樣品處理

參考 Shin 等 (2009) 方法，以磨米機將 YR 與 07TN67 磨成粉，保存於 4°C 備用。萃取方法為加入兩倍量的去離子水 (500 g : 1000 mL) 混合均勻，以超

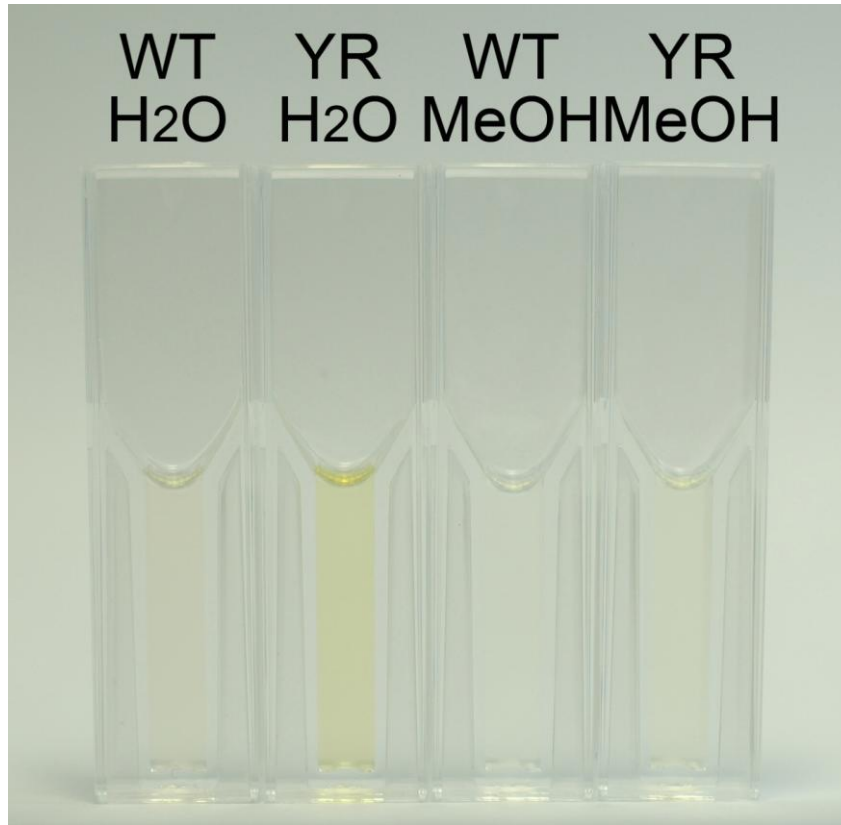
音波震盪器 (Branson® Ultrasonic cleaner 1510R-DTH, USA) 震盪 30 分鐘後浸泡 4°C 過夜，以 25°C 10000 g 離心 10 分鐘後，再以 Whatman No.1 濾紙過濾，重複兩次，各取 200 µL 之濾液放入 cuvette 中拍照並以全波長掃描機器 (U2800A, HITACHI) 檢測其吸收波長的範圍 (圖三)。另外將其他濾液以減壓濃縮機濃縮 (BÜCHI rotavapor R-124, vacuum pump V-700, vacuum controller V-850, waterbath B-C80)，直到體積小於 35 mL 離心管，將濾液轉移至 50 mL 離心管後，以冷凍乾燥機 (LABCONO CentriVap, RV12 pump, Cold trap, Refrigerated Centrifugal Concentrator) 乾燥並秤重，得到之乾燥樣品存放於 4°C 冰箱備用。

## 2 甲醇萃取之樣品處理

參考 Mendiola 等 (2008) 方法。取黃米與白米之粉末各 20 g，加入 100 mL 70% 之甲醇溶液，放入超音波震盪器中震盪 15 分鐘後，加入磁石置於加熱攪拌器上攪拌過夜 (圖三)。將其離心 10000x g 5 分鐘，取上清液以減壓濃縮機與冷凍乾燥機將其乾燥，秤取乾重並以等比例回溶於 100% 甲醇，並放於 4°C 冰箱備用。

## 3 乙醇萃取之樣品處理

參考 Mendiola 等 (2008) 方法。取黃米與白米粉末各 20 g，以乙醇萃取，於超音波震盪器中震盪 10 分鐘後並浸泡過夜。離心 10000x g 10 分鐘，以減壓濃縮機將體積減少至 5 mL 左右，調整溶劑體積，使黃米與白米之樣品濃度相等，並放於 4°C 冰箱備用。



圖三、利用水與甲醇溶劑萃取之萃取液顏色

WT H<sub>2</sub>O：白米水萃取物；YR H<sub>2</sub>O：黃米水萃取物；WT MeOH：  
白米 70% 甲醇萃取物；YR MeOH：黃米 70% 甲醇萃取物。

**Figure 3.** Wild type and yellow rice extract by water or methanol

WT H<sub>2</sub>O: water extract of wild type; YR H<sub>2</sub>O: water  
extract of yellow rice; WT 70% MeOH: 70% methanol extract of  
wild type; YR 70% MeOH: 70% methanol extract of yellow rice.



#### 4 薄膜層析法分析

參考 Ohta 等 (1990) 之方法。取白米與黃米之水萃取液以及 70% 甲醇萃取液，以毛細孔吸取萃取液點在 TLC 片約 20 次，以吹風機加速 TLC 片乾燥並放入層析槽，以 Dichromethane: Methanol: H<sub>2</sub>O: Formic acid = 5 : 3 : 0.5 : 0.2、Dichromethane : Methanol : H<sub>2</sub>O = 7 : 2 : 0.2、Hexane : acetone = 2 : 5 沖堤相分析此黃色物質之極性大小。當沖堤相跑至 TLC 片之頂端後，將 TLC 片拿出，以吹風機烘乾並將濃硫酸噴於 TLC 片並於高溫下呈色。

#### 5 黃米與白米之黃色成分比較

水萃取液經由 HPLC 分離並收集之萃取液，乾燥後得到重量為 2.69 g 黃米萃取物和 2.448 g 白米萃取物。各取其三分之一重量 (黃米 0.897 g; 白米 0.816 g)，回溶於 1.5 mL 50% 甲醇，接著於 25°C 7500x g 離心 3 分鐘，離心後分為上下兩層與沉澱物。上層液體為淡黃色，而下層液體為深黃色，取下層液體於新的微量離心管在 25°C 20000x g 離心 5 分鐘，上清液通過 0.45 μm 之過濾離心管，於 25°C 10000x g 離心 3 分鐘。將離心過後之濾液以 HPLC 分析，並比較兩種樣品之圖譜差異。

HPLC 條件如下：

機型為 Agilent Technologies 1200 series；管柱為 HYPERSIL® PEP300，4.6 × 250 mm；流速為 0.7 mL/min；偵測器為 UV/VIS detector 360 nm。

移動相含三種溶劑，分別為溶劑 A：0.01% TFA；溶劑 B：0.01% TFA in 40% MeOH；溶劑 C：0.01% TFA in 100% MeOH。

沖堤條件為 0 分鐘時 A : B : C = 95 : 5 : 0；30 分鐘時 A : B : C = 2 : 98 : 0；60 分鐘時 A : B : C = 0 : 0 : 100；75 分鐘時 A : B : C = 0 : 0 : 100。

## 6 黃米之黃色成分分子量與醣類分析

參考 Cheng 等 (2008) 方法。收集黃米與白米間之相異波峰液體，冷凍乾燥後，進行酒精沉澱反應，以分離游離醣和多醣。首先加入 250  $\mu\text{L}$  去離子水回溶，接著處理 80°C 6 小時。離心 10000x g 10 分鐘，取上清液加入 937.5  $\mu\text{L}$  乙醇存於 4°C 過夜。接著離心 10000x g 10 分鐘，上清液與沉澱物分別冷凍乾燥後，上清液回溶於 200 $\mu\text{L}$  水中，通過 0.22  $\mu\text{m}$  過濾膜後以凝膠過濾層析法 (size-exclusion chromatography, SEC) 分析其分子量大小。而沉澱物加入 250 $\mu\text{L}$  去離子水回溶後，亦通過 0.22  $\mu\text{m}$  過濾膜後也以 SEC 分析其分子量大小，每次取 100  $\mu\text{L}$  打入機器分析。

SEC 條件如下：

機型為 Viscotek；管柱為 G4000PW<sub>XL</sub>，7.8 × 300 mm；流速為 1 mL/min；偵測器為 RI detector；移動相為 H<sub>2</sub>O；沖提條件為 30 分鐘。

沉澱的部份，利用酸水解的方式，將多醣分解為單醣或雙醣。取 50  $\mu\text{L}$  沉澱部份之液體加入 450  $\mu\text{L}$  去離子水稀釋，接著取 100 $\mu\text{L}$  液體加入 1.6 mL 去離子水，再加入 300  $\mu\text{L}$  之三氯醋酸 (Trifluoroacetic acid, TFA) 放於 80°C 過夜，水解樣品。取 400  $\mu\text{L}$  水解液凍乾再回溶於 1 mL 去離子水，取 20  $\mu\text{L}$  以高效率陰離子交換層析法 (high-performance anion-exchange chromatography, HPAEC) 分析其醣類組成，另取 100  $\mu\text{L}$  以 SEC 分析分子量。上清液的部分為游離的醣類，故直接分析其醣類組成，取 50  $\mu\text{L}$  加入 450  $\mu\text{L}$  去離子水，接著取 10  $\mu\text{L}$  混合液加入 990  $\mu\text{L}$  去離子水，取 20  $\mu\text{L}$  注入機器分析。

HPAEC 條件如下：

機型為 Dionex BioLC；管柱為 PA-10，4.6 × 250 mm；流速為 1 mL/min；偵測器為 PAD-II；積分儀器為 PRIME DAK；移動相為 18 mM NaOH。

## 7 類黃酮之分析

將白米與黃米之 70% 甲醇萃取物通過 0.22  $\mu\text{m}$  過濾膜。各取 20  $\mu\text{L}$  注入 HPLC，進行差異圖譜波峰之比較。

HPLC 條件如下：

機型為 HITACHI；管柱為 HYPERSIL®HS C18，4.6  $\times$  250 mm；流速為 0.5 mL/min；偵測器為 360 nm；積分儀器為 D-2500 chromato-Integrator。

移動相含兩種溶劑，分別為溶劑 A：0.05% TFA in water；溶劑 B：0.05% TFA in 100% MeOH。

沖提條件為 0 分鐘時 A : B = 95 : 5；5 分鐘時 A : B = 95 : 5；30 分鐘時 A : B = 70 : 30；50 分鐘時 A : B = 0 : 100；60 分鐘時 A : B = 0 : 100。

## 8 類胡蘿蔔素之分析

將白米與黃米之乙醇萃取物通過 0.22  $\mu\text{m}$  過濾膜，將，各取 10  $\mu\text{L}$  打入 HPLC，比較圖譜波峰之差異。

HPLC 條件如下：

機型為 HITACHI；管柱為 YMC™ Carotenoid C30，4.6  $\times$  250 mm；流速為 1 mL/min；偵測器為 450 nm。

移動相含兩種溶劑，分別為溶劑 A：MeOH : MTBE : H<sub>2</sub>O = 81 : 15 : 4；溶劑 B：MeOH : MTBE = 6 : 90。

沖提條件為 0 分鐘時 A : B = 100 : 0；90 分鐘時 A : B = 0 : 100。

#### (四)、揮發性成分分析

取白米與黃米各 300 µg 粉末，以熱裂解儀連接氣相層析質譜儀 (gas chromatography mass spectrometry, GC-MS) 分析成分，機型為 TRACE GC / POLARISQ (Thermo Finnigan)，管柱為 DB-1701 (60m×0.25mm i.d., 0.25µm film thickness)；GC 之條件為於 35°C 維持 10 分鐘，接著以 3°C/min 之速率提升至 220°C，於 220°C 維持 28 分鐘；流速為 50 ml/min。

#### (五)、ALDH 在不同組織下之表現

##### 1 RNA 萃取

參考 Chomczynski 和 Sacchi (1993) 方法。以台農 67 之水稻植株之各部位為材料 (詳細資料於 (表二))，自試驗田採集後先以液態氮快速冷凍再存放於 -80°C 冰箱備用。材料於液態氮中研磨成粉末狀，加入一倍體積 TRI REAGENT™ (Sigma, USA)，以 4°C 12000x g 離心 10 分鐘。接著將上清液移至另一微量離心管，放在室溫 5 分鐘，接著加入 0.2 倍體積的氯仿 (chloroform)，快速搖動 15 秒，放在室溫 10 分鐘，接著在 4°C 離心 12000x g 15 分鐘。取上層液至新的微量離心管，加入 2.5 倍體積之異丙醇 (Isopropanol) 混合均勻，放在室溫 10 分鐘，接著以 4°C 離心 12000x g 10 分鐘。去除上清液，加入 1 倍體積 75% 乙醇 (ethanol)，震盪 5 秒，再以 4°C 離心 7500x g 5 分鐘。去除上清液後，置於冰上風乾 30 分鐘，回溶於 30µL 無菌水。

將上述之 RNA 樣品通過 Invisorb® Spin Plant RNA mini kit (Invitex, Germany)；加入 900µL lysis Solution RP 至樣品中，室溫下持續震盪 30 分鐘。樣品離心 13000 g 1 分鐘後，取上清液至 receiver tube 離心 12000x g 1 分鐘，

加入 500 $\mu$ L 99.8% (w/w) 乙醇，混合均勻。取 750 $\mu$ L 溶液至 RTA-binding spin filter set，放置 1 分鐘後，離心 12000x g 1 分鐘，去除廢液，將剩餘的溶液加入 RTA-binding spin filter set 中，離心 12000x g 1 分鐘，去除廢液。加入 500 $\mu$ L wash buffer R1 離心 12000x g 30 秒，去除廢液。加入 750 $\mu$ L wash buffer R2 離心 12000x g 30 秒，去除廢液，重複兩次。將 filter 換置於新的微量離心管離心 15000x g 3 分鐘。加入 30  $\mu$ L 無菌水溶出 RNA，存放於-80 $^{\circ}$ C 冰箱備用。

## 2 逆轉錄聚合酶連鎖反應

參考 Mei 和 Lei(2007)之方法。使用 SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System RT-PCR Kit (Invitrogen)。取 1  $\mu$ g RNA 加 50 ng/ $\mu$ L random hexamers 1 $\mu$ L、10 mM dNTP mix 1  $\mu$ L，以無菌水補至 10  $\mu$ L。於 65 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘，置於冰上 1 分鐘。加入 cDNA Synthesis Mix 混合均勻，於 25 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘、50 $^{\circ}$ C 50 分鐘，接著再 85 $^{\circ}$ C 5 分鐘，置於冰上。加入 1 $\mu$ L RNase H 於 37 $^{\circ}$ C 反應 20 分鐘，放於-20 $^{\circ}$ C 冰箱中備用。

從水稻基因體中，設計 Os09g26880 的專一引子；為 RT-F、RT-R (表三)。使用 PCR Master Mix (GeneMark, U.S.A.) 進行聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)，條件為 cDNA 1 $\mu$ L、50 ng 引子各 1 $\mu$ L。反應溫度為 94 $^{\circ}$ C 3 分鐘(將 DNA 雙股螺旋打開)，進入循環 94 $^{\circ}$ C 30 秒，引子黏合溫度為 50 $^{\circ}$ C 30 秒，延展溫度為 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，共 25 的循環，最後 72 $^{\circ}$ C 3 分鐘完成實驗，於 4 $^{\circ}$ C 存放。控制組為 18s rRNA，將引子換成 50 ng 18s rRNA-F 與 18s rRNA-R 各 1 $\mu$ L (表三)。引子黏合溫度為 60 $^{\circ}$ C 30 秒，其他條件都相同。將 PCR 樣品，以 1% TBE(tris-borate ethylenediaminetetraacetic acid) agarose 膠片進行電泳分析，100 伏特電壓 1 小時後觀察結果。

表三、針對 *Os09g26880* 設計之專一引子與 18s rRNA 之引子

**Table 3.** Primer sequence for *Os09g26880* and 18s rRNA

Primer	Sequence
RT-F	ATTCTTCCTGAAGGGATTGG
RT-R	TTAGTGGGAACAATGCCATT
18s rRNA-F	GGGATGGGCCGGCCGGTCCGCCTT
18s rRNA-R	CTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCC

## (六)、水稻 ALDH 基因家族之分析

參考 Gao 和 Han 學者 (2009) 水稻之 20 個 *ALDH* 基因，以及由網路下載水稻 mRNA 20bp MPSS 資料(<http://mpss.udel.edu/rice/>) (Brenner *et al.*, 2000)，並於 DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>) 以 BLAST (Basic local alignment search tool) 方法比對，觀察此類基因在不同組織和處理下，mRNA 之表現情形。另外針對此 20 個基因，找出其分子量和等電點以及利用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) 預測可能之 motif 與功能。

## 第五章 結果

### 一、米粒一般成分測定

樣品共計四種，即黃米、白米、香米以及陳米，分別檢測粗蛋白、粗脂肪、水分和灰分含量，另外碳水化合物的部份以扣除法求得，結果列於（表四）。這四種樣品在各成分中皆顯著不同於其他三種。四種樣品主要成分皆為碳水化合物，約為 77%；其次為水分、粗蛋白，分別佔百分比之 14%和 8%；最少的為粗脂肪和灰份，佔百分比之 0.7%和 0.5%。碳水化合物含量由高至低為香米、陳米、白米以及黃米；粗蛋白含量由高至低為白米、黃米、陳米以及香米；粗脂肪含量由高至低為陳米、白米、黃米以及香米；水分含量由高至低為黃米、香米、白米以及陳米；灰份含量由高至低為陳米、白米、黃米以及香米。



表四、米粒基本成分分析

Table 4. Analysis of basic grain components

一般成分 \ 樣品	白米	黃米	香米	陳米
碳水化合物	76.4%±0.06 <sup>C</sup>	75.8%±0.15 <sup>D</sup>	77.6%±0.11 <sup>A</sup>	77.2%±0.13 <sup>B</sup>
粗蛋白	8.6%±0.00 <sup>A</sup>	8.4%±0.00 <sup>B</sup>	8.0%±0.00 <sup>D</sup>	8.2%±0.00 <sup>C</sup>
粗脂肪	0.9%±0.00 <sup>B</sup>	0.5%±0.00 <sup>C</sup>	0.2%±0.00 <sup>D</sup>	1.3%±0.00 <sup>A</sup>
水分	13.6%±0.00 <sup>C</sup>	14.9%±0.00 <sup>A</sup>	13.9%±0.00 <sup>B</sup>	12.6%±0.00 <sup>D</sup>
灰分	0.5%±0.00 <sup>B</sup>	0.4%±0.00 <sup>C</sup>	0.3%±0.00 <sup>D</sup>	0.7%±0.00 <sup>A</sup>

Means of triplicates ± standard deviation .

單位為%

a-d : Means followed by the same letters are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 二、 丙二醛含量分析

分析樣品包括不同年份收成之 TN67、07S、03TN71 和 YR，以 TBA 法檢測丙二醛含量，以推測脂質過氧化的程度。結果如（表五）所示，07S 所含有的丙二醛顯著高於其他樣品，含量為  $11.53\pm 0.77$  nmol/g；其次為 04TN67、05TN67 和 YR，含量分別為  $9.80\pm 0.74$ 、 $9.70\pm 0.73$  和  $9.46\pm 0.75$ ；接著為 06TN67 和 03TN71，含量各為  $8.75\pm 0.66$  和  $8.69\pm 0.00$ ；07TN67 為顯著低於其他樣品，含量為  $7.44\pm 0.56$  nmol/g。2008 年收成之黃米丙二醛含量與 2006 年收成之台農 67 號相似，推測為黃米本身因為基因突變，造成無法代謝丙二醛，造成累積的可能。

表五、丙二醛含量分析

Table 5. Analysis of MDA quantity

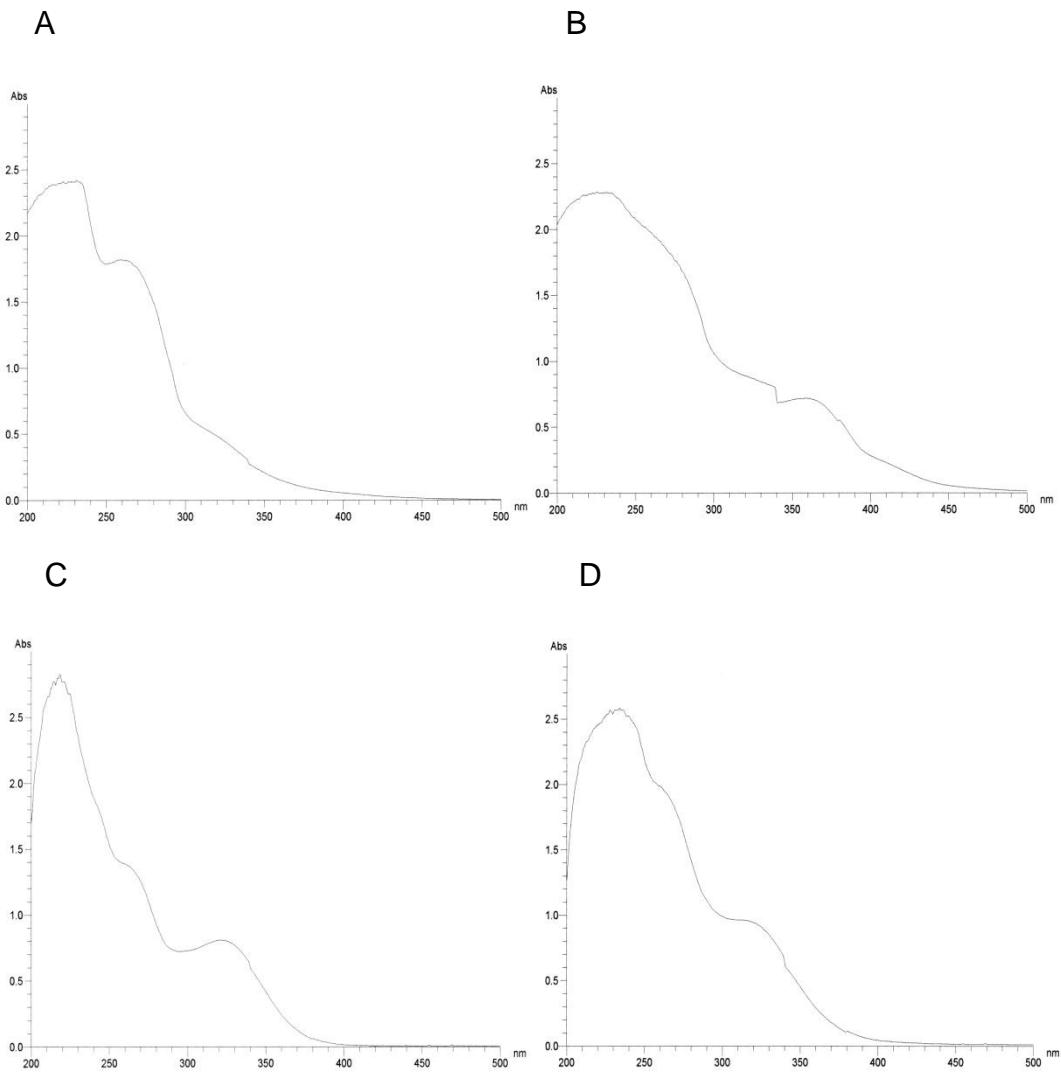
樣品	丙二醛含量(nmol/g)
07S	11.53±0.77 <sup>A</sup>
04TN67	9.80±0.74 <sup>BC</sup>
05TN67	9.70±0.73 <sup>BCD</sup>
YR	9.46±0.75 <sup>CD</sup>
06TN67	8.75±0.66 <sup>D</sup>
03TN71	8.69±0.00 <sup>D</sup>
07TN67	7.44±0.56 <sup>E</sup>

單位為nmol/g

a-e : Means followed by the same letters are not significantly different (P < 0.05).

### 三、黃米與白米黃色成分比較

黃米與白米之水萃取樣品以全波長掃描取得吸收光譜再分析其間之差異吸光值範圍(圖四),黃米樣品位於 360 nm 左右之吸光值大於白米樣品。另外以薄膜層析法(thin layer chromatography, TLC)分析其極性並嘗試找出沖提條件,結果指出黃色色素為極性物質,以 Dichromethane:Methanol:H<sub>2</sub>O: Formic acid =5 : 3 : 0.5 : 0.2 ; Dichromethane : Methanol : H<sub>2</sub>O=7 : 2 : 0.2 或是 Hexane : acetone=2 : 5 都無法將其分離(圖五)。以 HPLC 分析黃米與白米水萃取樣品(圖六),沖提條件從水轉換至甲醇,兩者樣品具有差異波峰之滯留時間都很短,在沖提條件為水較多時沖提出,黃米樣品在滯留時間為 4 至 8 分鐘之前有高於白米樣品 25 倍之許多波峰,黃米面積為 318569;白米面積為 12764。8 分鐘至 20 分鐘也有高於白米樣品約 44 倍之許多波峰,黃米面積為 340869 ;白米面積為 7808。以每管 500 μL 之速率收集黃米樣品 4 至 8 分鐘(M48)以及 8 至 20 分鐘(M820)波峰後,測定每管之吸光值並凍乾,顏色皆呈深褐色。

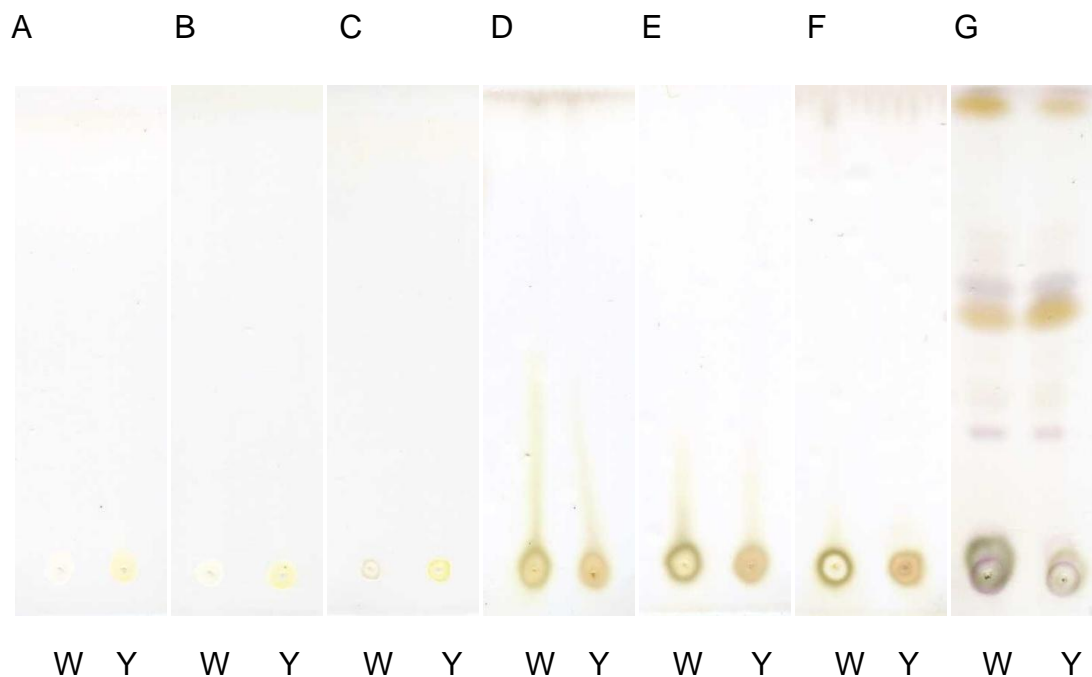


圖四、以全波長掃描分析萃取樣品之吸光值範圍

A 水萃取之白米；B 水萃取之黃米；C 甲醇萃取之白米；D 甲醇萃取之黃米。

**Figure 4.** Using full spectrum scan to examine optical density of extract

A water extract of wild type; B water extract of yellow rice; C methanol extract of wild type; D methanol extract of yellow rice.



**圖五**、使用薄膜層析法分析萃取樣品

A 至 F 為水萃取樣品；G 為 70% 甲醇萃取樣品。A 至 C 為原色，D 至 G 則以濃硫酸呈色。W：白米萃取液；Y：黃米萃取液。

沖提條件：

A、D：Dichromethane：Methanol：H<sub>2</sub>O：Formic acid =5：3：0.5：0.2

B、E：Dichromethane：Methanol：H<sub>2</sub>O=7：2：0.2

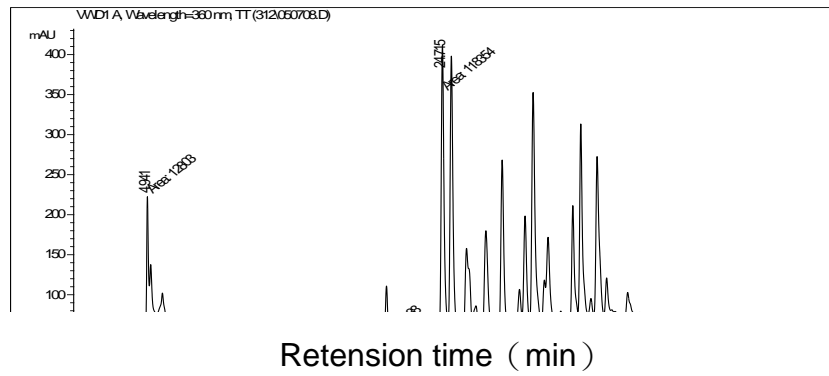
C、F：Hexane：acetone=2：5

G：Hexane：acetone=2：1

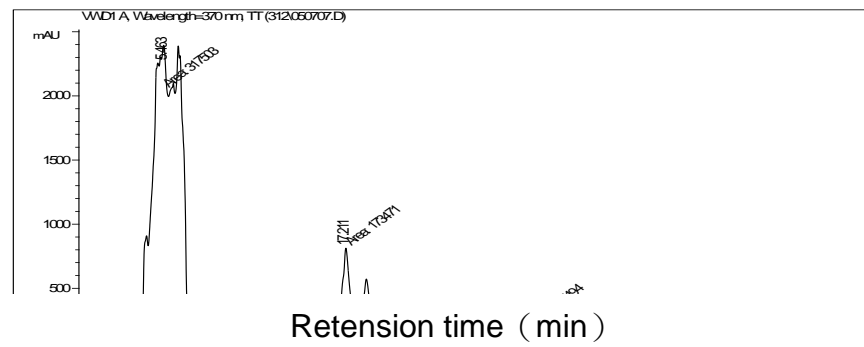
**Figure 5.** Extract sample analysis by thin layer chromatography

From A to F are water extract; G is 70% methanol extract. From A to C is original color; from D to G are used sulfuric acid react on samples.

A



B

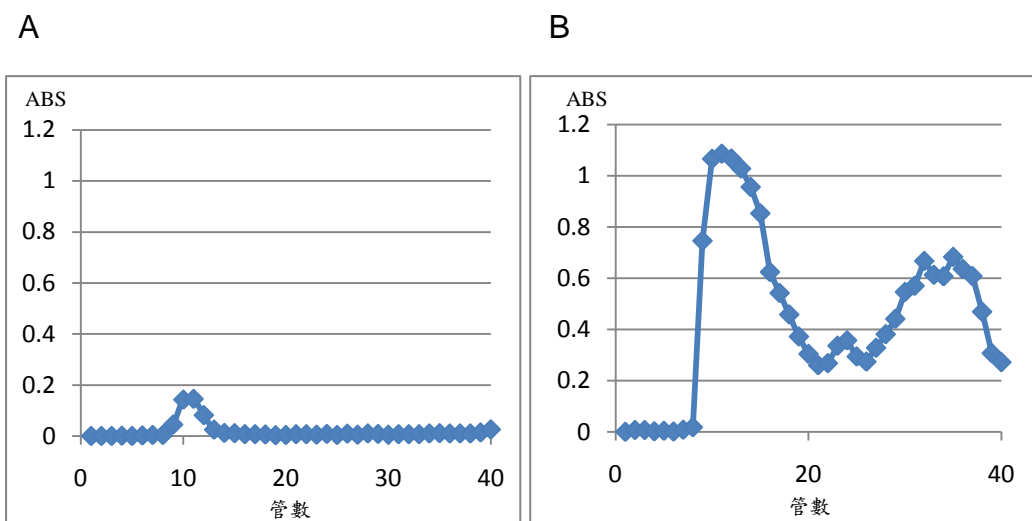


圖六、白米與黃米水萃取物之圖譜

A 白米之水萃取物；B 黃米之水萃取物

**Figure 6.** High-performance liquid chromatography profile of the water extract analyzed

A chromatogram of wild type; B chromatogram of yellow rice.



圖七、收集 HPLC 滯留時間 20 分鐘前之液體及每管於 360 nm 之吸光值

A 白米萃取液每管吸光值；B 黃米萃取液每管吸光值。

**Figure 7.** the absorbance of water extract from HPLC

A the absorbance of wild type water extract before 20 minute; B the absorbance of yellow rice water extract before 20 minute.



#### 四、分子量分析

將黃米與白米之水萃取樣品經過 HPLC 分離並收集樣品，樣品分別為 M48 與 M820。經過酒精沉澱後，分為上清液與沉澱，上清液的部分為游離糖；沉澱部份為多醣。(表六) 為根據 (圖八) 針對特定波峰或範圍利用軟體計算出主要分子量、平均分子量以及面積。上清液的部份，M48 主要之波峰為 A1，平均分子量為 1140，主要分子量 1066，面積為 952.8 (mV x mL)。M820 主要之波峰為 C2、C3 和 C4，平均分子量分別為 1953、1593 和 928，主要分子量為 1772、1445 和 856，面積為 7.5、6.5 與 22.3 (mV x mL)。M48 和 M820 上清液的分分子量平均皆小於沉澱部份。沉澱的部份，M48 主要之波峰為 B2、B3 和 B4，平均分子量為 5789、1856 與 1099，主要分子量為 10530、1705 和 1013，面積為 198.3、137.3 和 149.5 (mV x mL)。M820 主要之波峰為 D3，平均分子量為 13950，主要分子量為 17350，面積為 47.3 (mV x mL)。M48 之沉澱物經過酸水解後，再次分析分子量大小，主要波峰為 E1、E2 和 E3，平均分子量為 9978、1335 與 819，主要分子量為 9080、1251 和 749，面積為 1.7、1.9 和 2.6 (mV x mL)。

表六、凝膠過濾層析法之分子量分析表

英文字母與數字對應於圖八。

**Table 6.** Molecular weight list of SEC

English letters of the alphabet and numbers are correspondence with Figure 8.

A		
	1	2
Mn	1140*	622
Mw	1066	566
RI	952.8	110.0

B				
	1	2	3	4
Mn	73540	5789	1856	1099
Mw	153400	10530	1705	1013
RI	38.6	198.3	137.3	149.5

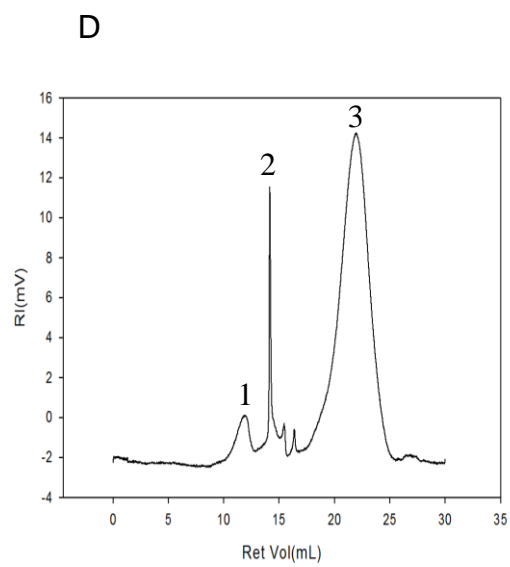
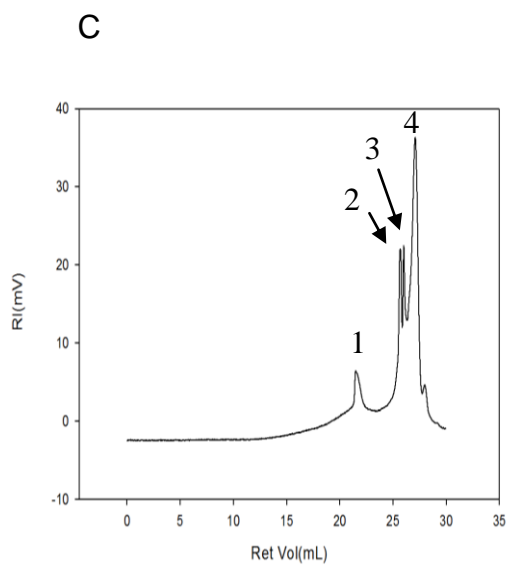
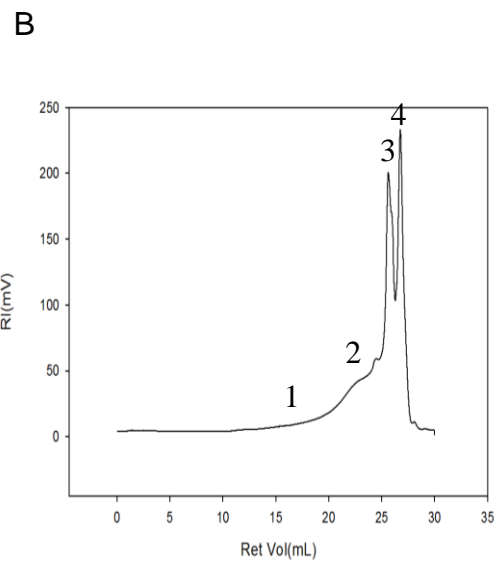
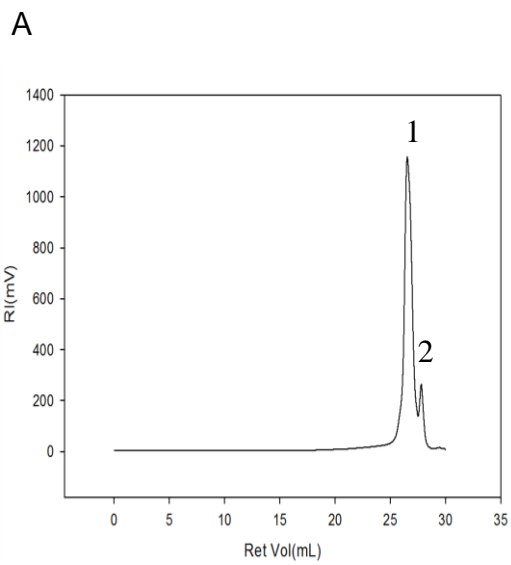
C				
	1	2	3	4
Mn	17090	1953	1593	928
Mw	15930	1772	1445	856
RI	6.9	7.5	6.5	22.3

D			
	1	2	3
Mn	3685000	1009000	13950
Mw	3499000	917800	17350
RI	3.0	2.9	47.3

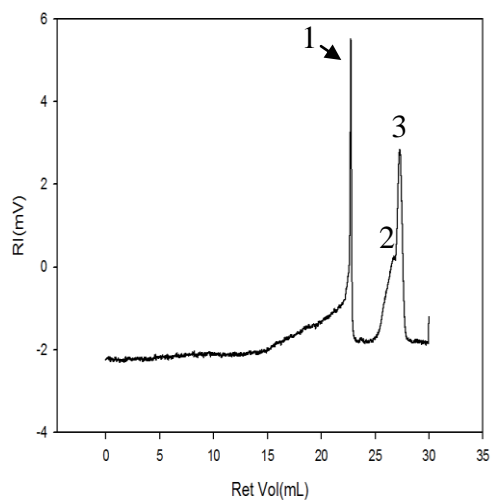
E			
	1	2	3
Mn	9978	1335	819
Mw	9080	1251	749
RI	1.7	2.0	2.6

Mn 為平均分子量、Mw 為主要分子量、RI 為積分面積

\* mV x mL



E



圖八、以凝膠過濾層析法分析白米與黃米之差異波峰

A M48 上清液；B M48 沉澱物；C M820 上清液；D M820 沉澱物；E M48 酸水  
解後之主要波峰沉澱物。

**Figure 8.** Size-exclusion chromatography (SEC) profile of M48 and M820

A supernatant of M48 peaks; B pellet of M48 peaks; C supernatant of M820  
peaks; D pellet of M820 peaks; E pellet of M48 peaks by hydrolysis.

## 五、 醣類分析

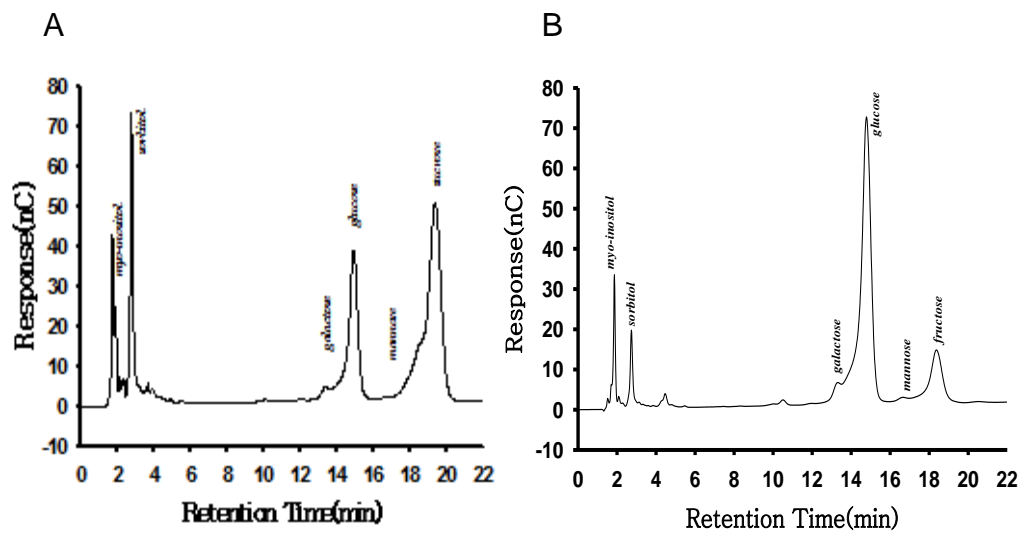
M48 之上清液為游離醣，可以直接分析醣類組成；而沉澱部分則需經過酸水解才能分析醣類組成。上清液與沉澱都含有 myo-inositol、sorbitol、galactose、glucose、mannose、fructose 和 sucrose (圖九、表七)。沉澱的部份，glucose 和 fructose 佔沉澱全部之 47.4% 以及 39.4%。上清液的部份，sucrose 和 sorbitol 佔上清液全部之 61.9% 和 18.8%。另外沉澱獨有 fructose，而上清液獨有 sucrose (圖九、表七)。

表七、M48 醣類組成分析表

**Table 7** Sugar composition of polysaccharides about M48

	黃米沉澱	相對值	黃米上清液	相對值
myo-inositol	79.92±0.61*	2.8%	202.48±3.15	2.9%
sorbitol	130.32±5.96	4.6%	1311.23±15.2	18.8%
galactose	103.99±1.77	3.7%	241.99±31.53	3.5%
glucose	1337.1±4.61	47.4%	773.71±26.67	11.1%
mannose	58.30±2.7	2.1%	124.48±21.33	1.8%
fructose	1113.35±2.54	39.4%	0	0.0%
sucrose	0	0.0%	4311.68±16.91	61.9%

\*µmol/g



圖九、以高效率陰離子交換層析儀分析 M48 之醣類組成

**Figure 9.** High-performance anion-exchange chromatography (HPAEC) of M48

A chromatogram of M48 supernatant; B chromatogram of M48 hydrolysates.

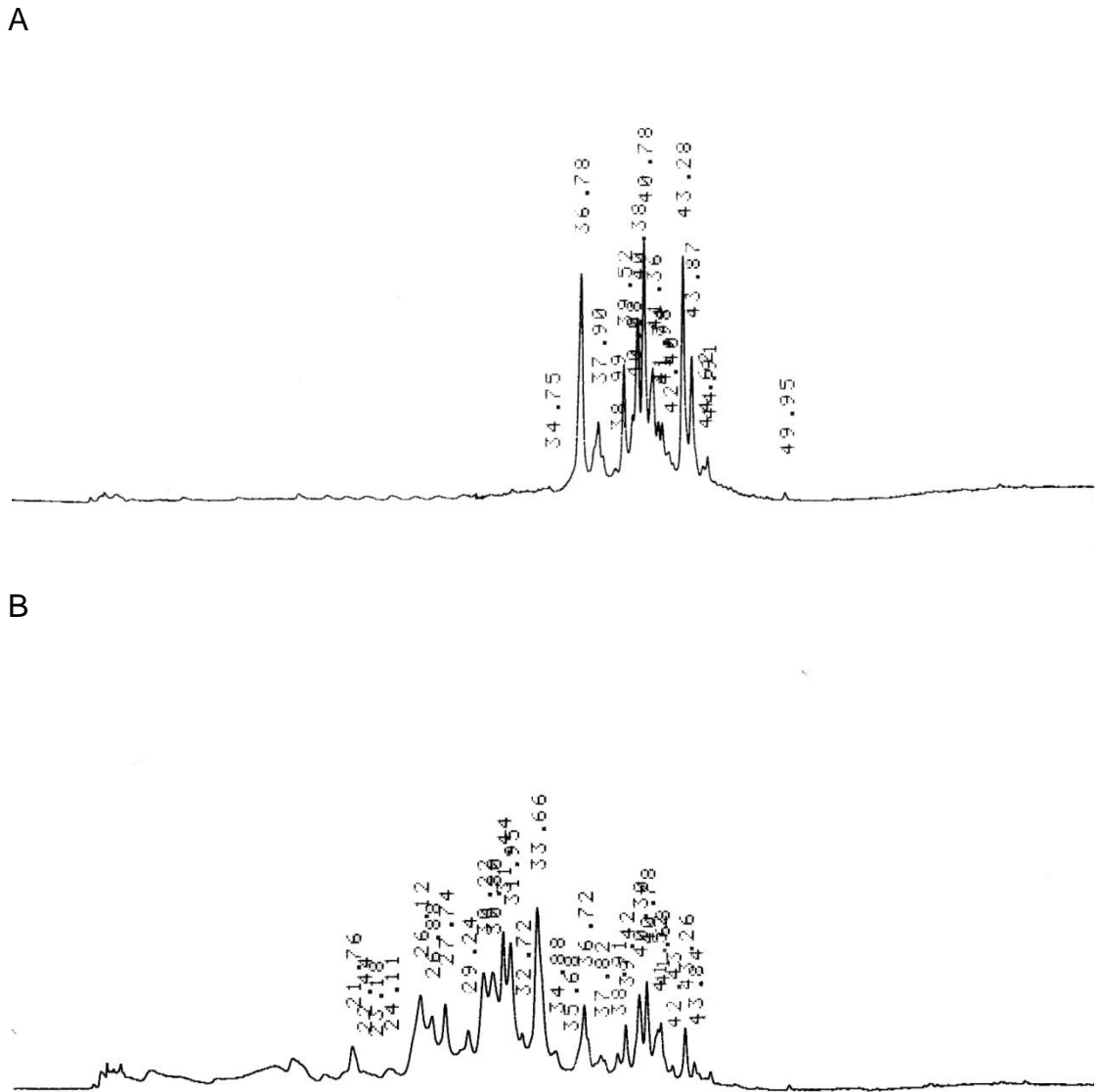
## 六、類黃酮萃取與測定

以 HPLC 分析 70% 甲醇萃取黃米與白米之類黃酮，黃米於滯留時間 36.72 之前有許多不同於白米之波峰，而滯留時間 36.72 之後之波峰比白米滯留時間 36.78 要小，故推測黃米有不同於白米之成分，而且此成分為白米滯留時間為 36.72 之後的成分轉變而成，但是轉變而成的物質並非主要黃色成分之物質（圖十）。

## 七、類胡蘿素萃取與測定

以 HPLC 分析乙醇萃取黃米與白米之類胡蘿素，兩種樣品皆沒有波峰，由此可知，兩個樣品皆未含有類胡蘿素（圖十一）。於滯留時間 50 分鐘左右時，兩個樣品都有一個波峰，為機器不穩定再加上 Y 軸單位非常小所造成。





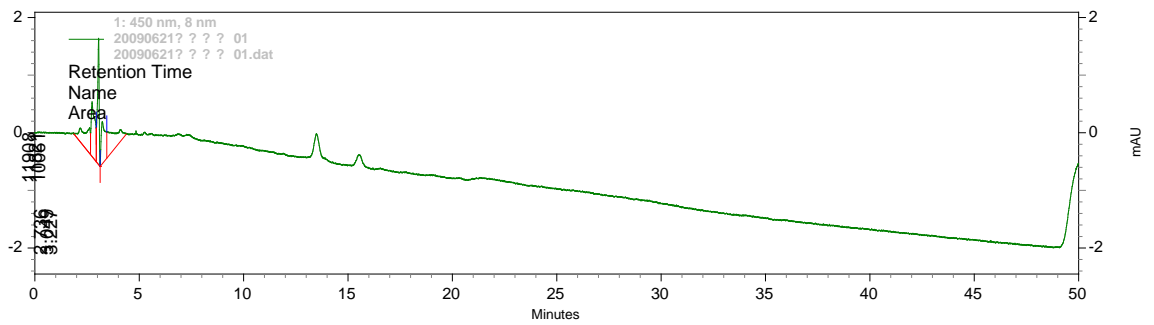
圖十、白米與黃米粉末之 70% 甲醇萃取物圖譜

A 白米之 70% 甲醇萃取物；B 黃米之 70% 甲醇萃取物。

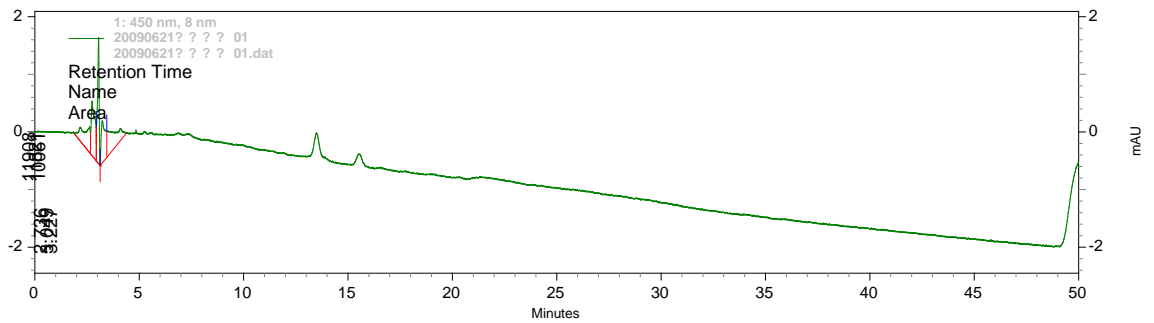
**Figure 10.** High-performance liquid chromatography profile of the rice grain powder of 70% MeOH extract analyzed

A chromatogram of wild type; B chromatogram of yellow rice.

A



B



圖十一、白米與黃米粉末之乙醇萃取物圖譜

A 白米之乙醇萃取物；B 黃米之乙醇萃取物。

**Figure 11.** High-performance liquid chromatography profile of the rice grain powder of EtOH extract analyzed

A chromatogram of wild type; B chromatogram of yellow rice.

## 八、揮發性成分分析

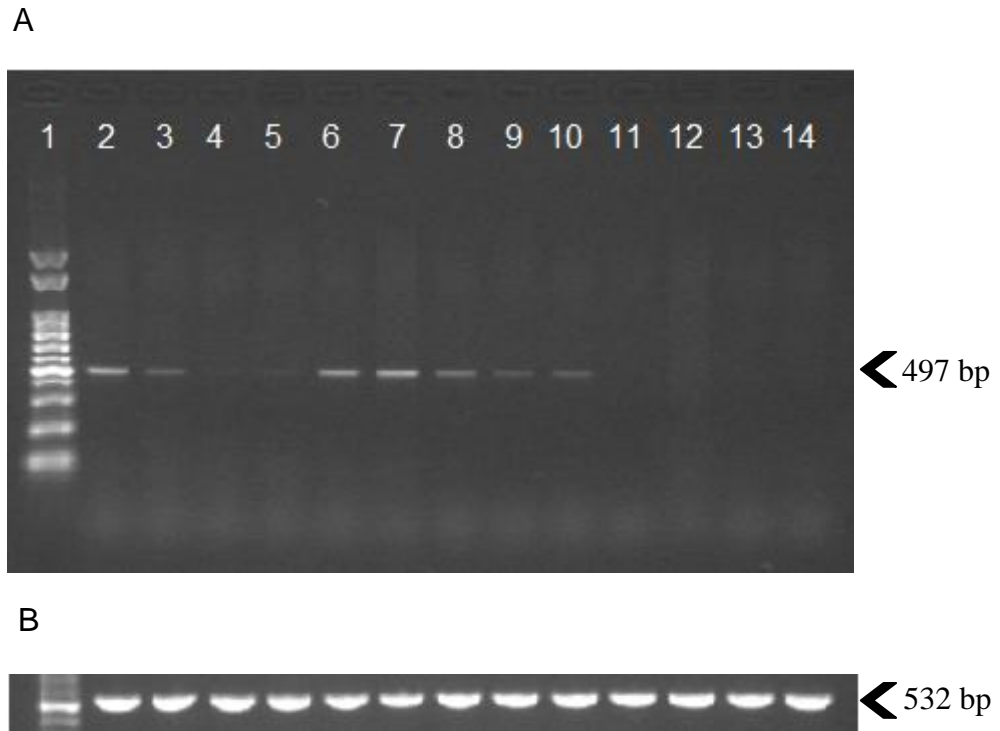
以熱裂解方式處理白米與黃米，再由 GC-MS 分析，經資料庫比對出有三個物質的含量較高，分別為 furfural、5-(hydroxymethyl)-2-furfural 和 2-ethylhydroxy-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone，白米的滯留時間為 26.07、55.88 和 59.34，分別佔全部之含量為 12%、19%和 18%。黃米的滯留時間為 25.83、55.35 與 58.68，分別佔全部之含量為 10%、20%和 33%（圖十四、圖十五）。滯留時間為 78 以及 90 左右的波峰則為資料庫中沒有比對到資料，故無法得知其結構為何。白米之 furfural、5-(hydroxymethyl)-2-furfural 和 2-ethylhydroxy-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone 含量分別為黃米的 11 倍、8 倍和 5 倍。

## 九、ALDH 在不同組織下之表現

（圖十二）為水稻在授粉後不同天數 RNA 表現的相對量。從編號 1 至 14 分別為 100 bp marker、G1、G2、G3、Em4、Em5、Em6、Em7、Em8、Eb4、Eb5s、Eb6、Eb7 以及 Eb8（詳細資料於（表二））。另外採用 18s rRNA 做為確定注入之 RNA 濃度為相同的佐證。實驗發現水稻在授粉後 1~3 天之表現量較高，而後隨著授粉天數的增加，表現在相對減少，直到授粉後 14~16 天，表現量變高，至授粉後 19 天表現量又逐漸的下降。主要表現的部位在胚乳，胚在授粉後 10~13 天之後即沒有觀察到表現。

（圖十三）為水稻不同組織與處理之表現情形，從編號 1 至 14 分別為 100 bp marker、NYL、NYR、NCA、NSL、NAL、P3、P8、P13、P20、P28、PF、PHW 以及 PWL（詳細資料於（表二））。同樣以 18s rRNA 引子做為注入 RNA 量相同的佐證。實驗發現表現量相對高於生長 14 天之葉子的為經過 150  $\mu\text{m}$  鹽處理之葉子和不同花序之花。生長 14 天之葉子與經過 20  $\mu\text{m}$  ABA 處理之葉子，

兩者表現在相當。生長 14 天的根與生長 35 天之癒傷組織，兩者表現低於生長 14 天之葉子。在田間自然爆開之成熟花粉以及處理於高濕度的環境下，接著使用白熱燈強迫花粉爆開的兩個處理，幾乎沒有表現。



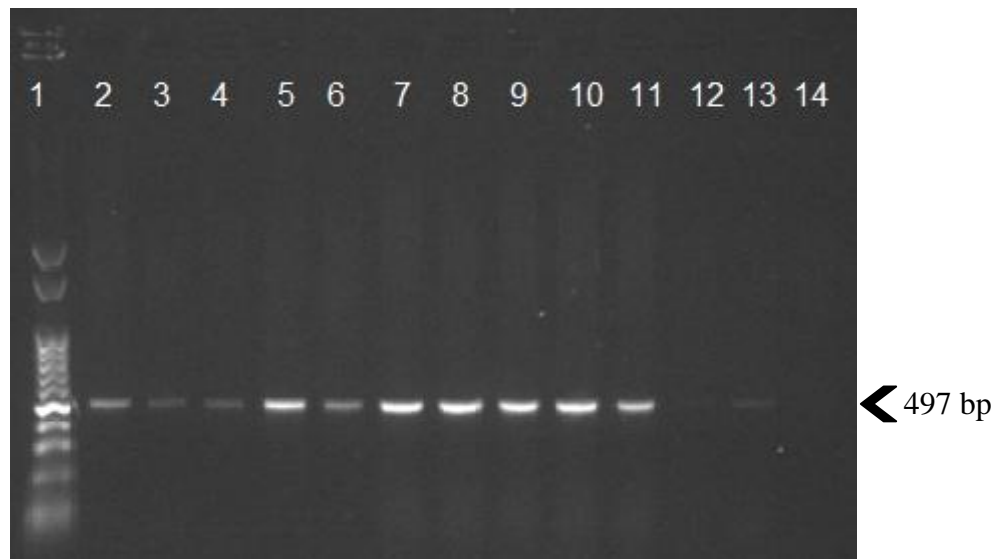
圖十二、以逆轉錄聚合酶連鎖反應分析水稻授粉後不同天數 RNA 表現的相對量

A 圖由 1 至 14 分別為 100bp marker、G1、G2、G3、Em4、Em5、Em6、Em7、Em8、Eb4、Eb5、Eb6、Eb7 和 Eb8 (詳細資料參考 (表二)); B 圖為 18s rRNA 結果。

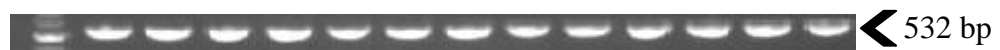
**Figure 12.** Expression pattern of *Os09g26880* during seed development analyzed by RT-PCR

A The ranked from 1 to 14 are 100 marker, G1, G2, G3, Em4, Em5, Em6, Em7, Em8, Eb4, Eb5, Eb6, Eb7 and Eb8(detail in (表二)); B 18s rRNA was used to monitor equal loading.

A



B



圖十三、以逆轉錄聚合酶連鎖反應分析水稻不同組織與處理 RNA 表現的相對量

A 圖由 1 至 14 分別為 100 bp marker、NYL、NYR、NCA、NSL、NAL、P3、P8、P13、P20、P28、PF、PHW 及 PWL (詳細資料參考 (表二));

B 圖為 18s rRNA 結果。

**Figure 13.** Expression pattern of *Os09g26880* during different stress and tissue analyzed by RT-PCR

A The ranked from 1 to 14 are 100 bp marker、NYL、NYR、NCA、NSL、NAL、P3、P8、P13、P20、P28、PF、PHW and PWL(detail in (Table 2));

18s rRNA was used to monitor equal loading.

## 十、水稻 ALDH 基因家族之分析

(表八) 為參考 Gao 和 Han 學者找出水稻 20 個 *ALDH* 基因，針對此類基因，整理出基因在染色體上的位置、轉譯出蛋白質之分子量以及等電點。水稻 20 個 *ALDH* 基因中，屬於第 2 家族有 5 個基因；第 3 家族有 5 個基因；第 5、6、7、11、12 和 22 分別只有 1 個基因；第 10 家族有 2 個基因；第 18 家族有 2 個基因。代號為 OsALDH7 為黃米之突變基因，屬於第 7 家族之基因，針對此基因，利用 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 預測出之分子量為 54.5 KDa，等電點為 6.7。

(表九) 為針對 OsALDH7，利用 BLAST 比較序列，發現大部分都是以葉子為材料，而 Query 為 CK078131、CX107533、CK084384 和 BP432941 採用全株植物；BP184642 採用花；AB178669 採用幼苗並加以鹽處理 5 小時。由此表可知 OsALDH7 基因會表現於生長葉子、花以及鹽處理之幼苗。

表八、水稻 *ALDH* 基因 locus ID、分子量、等電點與胺基酸數目

**Table 8.** Locus ID, molecular weight, pI and amino acid number of *Oryza*

*sativa* *ALDH* gene

代號	TIGR_Gene	分子量(KDa)	等電點	胺基酸數目
OsALDH2-1	LOC_Os01g40860	54.2	6.4	502
OsALDH2-2	LOC_Os01g40870	54.2	5.6	507
OsALDH2-3	LOC_Os06g39230	45.4	6.4	423
OsALDH2-4	LOC_Os02g49720	62.4	6.6	583
OsALDH2-5	LOC_Os06g15990	59.3	6.3	549
OsALDH3-1	LOC_Os02g43194	54.5	6.6	487
OsALDH3-2	LOC_Os02g43280	54.6	9.2	491
OsALDH3-3	LOC_Os04g45720	54.3	8.9	499
OsALDH3-4	LOC_Os11g08300	52.5	8.4	482
OsALDH3-5	LOC_Os12g07810	52.4	9.4	484
OsALDH5	LOC_Os02g07760	56.1	8.3	527
OsALDH6	LOC_Os07g09060	57.2	6.0	534
OsALDH7	LOC_Os09g26880	54.5	6.7	509
OsALDH10-1	LOC_Os04g39020	54.6	6.6	505
OsALDH10-2	LOC_Os08g32870	54.7	5.4	503
OsALDH11	LOC_Os08g34210	53.4	6.6	499
OsALDH12	LOC_Os05g45960	51.4	6.1	464
OsALDH18-1	LOC_Os01g62900	79.5	6.1	735
OsALDH18-2	LOC_Os05g38150	77.7	6.4	716
OsALDH22	LOC_Os07g48920	66.0	7.5	597

參考 Gao 和 Han 學者 (2009) 發現之水稻醛脫氫酶



表九、利用 BLAST 比對 AK119560 在水稻表現部位

**Table 9.** Compare the sequence of AK119560 with DDBJ database by

BLAST					
Query	Identified	tissue_type	dev_stage		note
CB668570	815/831 (98%)	Leaf	3 week		
CB660759	806/825 (97%)	Leaf	3 week		
CB644271	778/794 (97%)	Leaf	3 week		
CB635080	781/798 (97%)	Leaf	3 week		
CB665477	763/779 (97%)	Leaf	3 week		
CB624476	771/788 (97%)	Leaf	3 week		
CB628926	759/776 (97%)	Leaf	3 week		
CB633543	756/773 (97%)	Leaf	3 week		
CB617895	726/743 (97%)	Leaf	3 week		
CB618136	723/742 (97%)	Leaf	3 week		
CB634472	719/739 (97%)	Leaf	3 week		
CB661220	666/686 (97%)	Leaf	3 week		
CB652130	662/684 (96%)	Leaf	3 week		
CB681311	637/655 (97%)	Leaf	3 week		
CB663959	657/680 (96%)	Leaf	3 week		
CT843430	620/639 (97%)				
BP184642	598/618 (96%)	Panicle	germ cell	generating	stage
CB640975	565/583 (96%)	Leaf	3 week		
CB641126	562/579 (97%)	Leaf	3 week		
CB640035	550/567 (97%)	Leaf	3 week		
CB662043	782/798 (97%)	Leaf	3 week		
CB633532	759/777 (97%)	Leaf	3 week		
CK078131	611/612 (99%)	whole plant	booting		
CB652320	830/835 (99%)	Leaf	3 week		
CB652322	719/721 (99%)	Leaf	3 week		
CB629516	661/662 (99%)	Leaf	3 week		
CB657721	808/810 (99%)	Leaf	3 week		

Query	Identified	tissue_type	dev_stage	note
CB622489	786/790 (99%)	Leaf	3 week	
CB669527	847/850 (99%)	Leaf	3 week	
CB643880	809/810 (99%)	Leaf	3 week	
CF310058	574/576 (99%)	Leaf	14 days germination	after
CB652147	764/765 (99%)	Leaf	3 week	
AB178669	827/845 (97%),	seedling	2 weeks	250mM NaCl for 5 h
CB673763	792/794 (99%)	Leaf	3 week	
CF304224	556/558 (99%)	Leaf	14 days germination	after
CB664930	805/807 (99%)	Leaf	3 week	
CB671109	767/769 (99%)	Leaf	3 week	
CB664888	745/749 (99%)	Leaf	3 week	
CB670104	731/735 (99%)	Leaf	3 week	
CB666549	523/524 (99%)	Leaf	3 week	
CB664879	802/804 (99%)	Leaf	3 week	
CB664838	768/772 (99%)	Leaf	3 week	
CB664922	762/765 (99%)	Leaf	3 week	
CB638237	568/572 (99%)	Leaf	3 week	
CX107533	574/576 (99%)	whole plant	whole-life-cycle	
CB660213	793/796 (99%)	Leaf	3 week	
CB660215	760/779 (97%)	Leaf	3 week	
CB660252	731/742 (98%)	Leaf	3 week	
CK084384	571/574 (99%)	whole plant	booting	
BP432941	610/616 (99%)	whole plant	seedling	

(表十) 為針對水稻 20 個 *ALDH* 基因，以 InterProScan 軟體預測其可能之 motif，除了 OsALDH18-1 和 18-2 外，其他基因皆有 aldehyde dehydrogenase motif；屬於 OsALDH 第三家族的都具有 aldehyde dehydrogenase NAD(P)-dependent；OsALDH2-3、5、10-1 和 22 具有 aldehyde dehydrogenase, conserved site CYS 與 aldehyde dehydrogenase, conserved site GLU；而 OsALDH7 與 10-2 只具有 aldehyde dehydrogenase, conserved site GLU。OsALDH18-1 與 18-2 具有 aldehyde dehydrogenase, C-terminal；除了 OsALDH2-3 不含有 aldehyde/histidinol dehydrogenase，水稻全部 *ALDH* 基因都具有 aldehyde dehydrogenase, N-terminal 與 aldehyde/histidinol dehydrogenase；OsALDH 第 18 家族獨有 aspartate/glutamate/uridylate kinase、delta l-pyrroline-5-carboxylate synthetase、gamma-glutamyl phosphate reductase、glutamate 5-kinase 與 glutamate 5-kinase, ProB-related。OsALDH22 獨有 carbohydrate kinase, FGGY, conserved site；OsALDH6 獨有 methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase；OsALDH5 獨有 succinic semialdehyde dehydrogenase。黃米所突變之基因 OsALDH7，與其他 *ALDH* 基因 motif 的比較上，只有在尚未整合的 motif 中獨有 aldehyde dehydrogenase 7 與 transmembrane regions。

(表十一) 為水稻米粒在未成熟時，其 mRNA 表現情形。有表現的為 OsALDH2-1、2-5、3-4、5、6、7、10-1、11 和 12，當中表現在較高的為 OsALDH6、7 和 11。

表十、利用 InterProScan 預測水稻 *ALDH* 基因可能 motif

**Table 10.** To use InterProScan predict the motif of *ALDH* gene in rice

OsALDH	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5
Aldehyde dehydrogenase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Aldehyde dehydrogenase NAD(P)-dependent						X	X	X	X	X
Aldehyde dehydrogenase, conserved site CYS			X							
Aldehyde dehydrogenase, conserved site GLU			X							
Aldehyde dehydrogenase, C-terminal										
Aldehyde dehydrogenase, N-terminal	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Aldehyde/histidinol dehydrogenase	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Aspartate/glutamate/uridylate kinase										
Carbohydrate kinase, FGGY, conserved site										
delta l-pyrroline-5-carboxylate synthetase										
Gamma-glutamyl phosphate reductase GPR										
Glutamate 5-kinase										
Glutamate 5-kinase, ProB-related										
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase										
Succinic semialdehyde dehydrogenase										
unintegrated (including down)	X	X		X	X					
ALDEHYDE DEHYDROGENASE			X							
ALDEHYDE DEHYDROGENASE 7										
BETAINE-ALDEHYDE DEHYDROGENASE										
DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHETASE										
GLUTAMATE SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE										
signal-peptide										
transmembrane_regions										

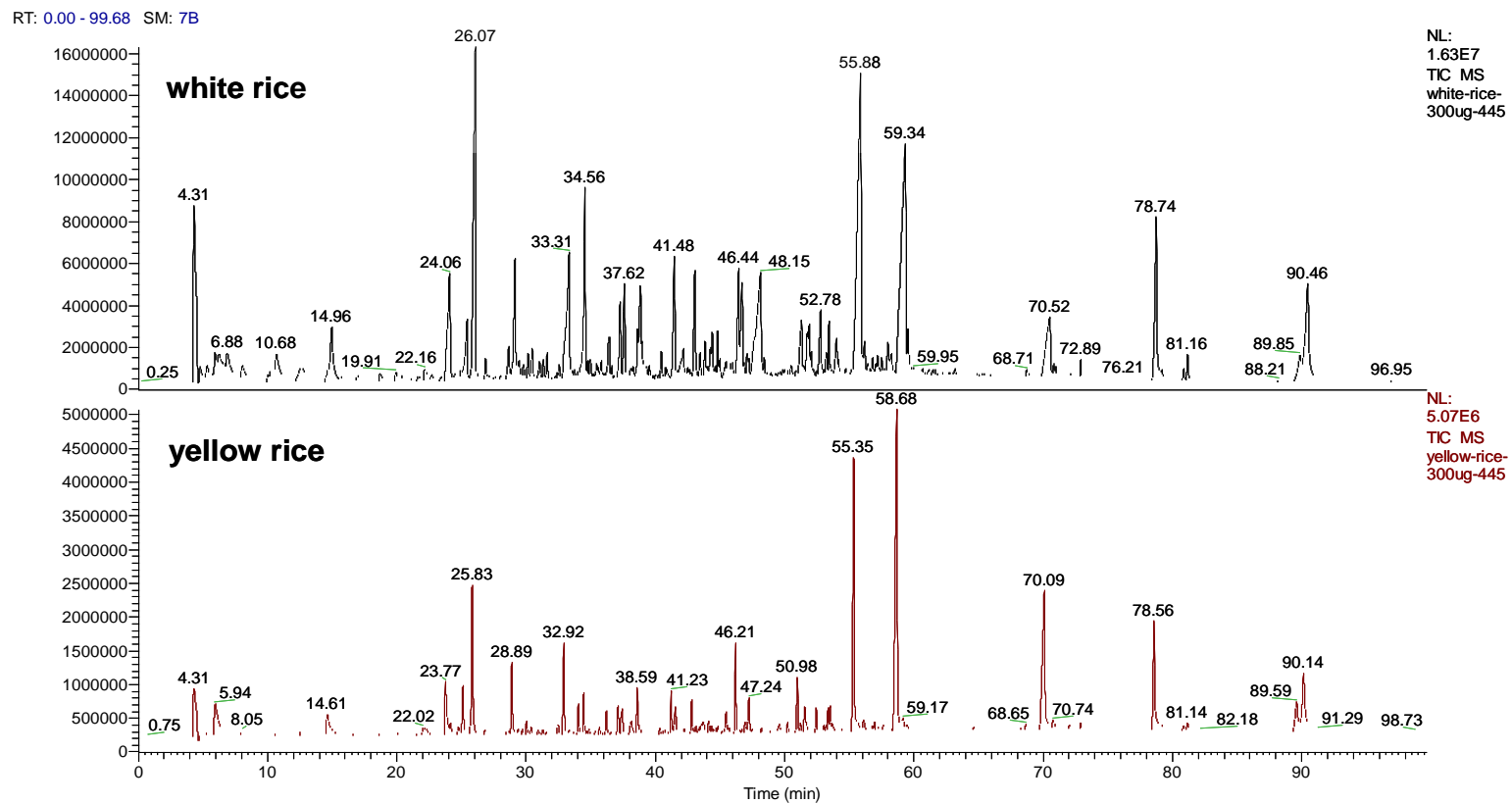
OsALDH	5	6	7	10-1	10-2	11	12	18-1	18-2	22
Aldehyde dehydrogenase	X	X	X	X	X	X	X			X
Aldehyde dehydrogenase NAD(P)-dependent										
Aldehyde dehydrogenase, conserved site CYS	X		X							X
Aldehyde dehydrogenase, conserved site GLU	X		X	X	X					X
Aldehyde dehydrogenase, C-terminal								X	X	
Aldehyde dehydrogenase, N-terminal	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Aldehyde/histidinol dehydrogenase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Aspartate/glutamate/uridylate kinase								X	X	
Carbohydrate kinase, FGGY, conserved site										X
delta l-pyrroline-5-carboxylate synthetase								X	X	
Gamma-glutamyl phosphate reductase GPR								X	X	
Glutamate 5-kinase								X	X	
Glutamate 5-kinase, ProB-related								X	X	
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase		X								
Succinic semialdehyde dehydrogenase	X									
unintegrated (including down)	X					X	X	X		
ALDEHYDE DEHYDROGENASE										X
ALDEHYDE DEHYDROGENASE 7			X							
BETAINE-ALDEHYDE DEHYDROGENASE			X	X						
DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHETASE									X	
GLUTAMATE SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE									X	
signal-peptide										X
transmembrane_regions			X							

表十一、MPSS 資料中未成熟米粒之 mRNA 表現

**Table 11.** mRNA expression of immature grain (IG) in MPSS database

Gene	Treat	IG
OsALDH2-1		7
OsALDH2-2		0
OsALDH2-3		0
OsALDH2-4		0
OsALDH2-5		2
OsALDH3-1		0
OsALDH3-2		0
OsALDH3-3		0
OsALDH3-4		4
OsALDH3-5		0
OsALDH5		62
OsALDH6		267
OsALDH7		145
OsALDH10-1		33
OsALDH10-2		0
OsALDH11		467
OsALDH12		39
OsALDH18-1		0
OsALDH18-2		0
OsALDH22		0

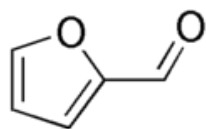
\*IG 為水稻尚未成熟之米粒



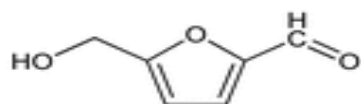
圖十四、白米與黃米以熱裂解方式再以 GC-MS 分析之結果

Figure 14. Gas chromatography-mass spectrometry profile of WT rice and yellow rice powder

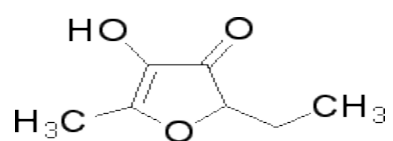
A furfural



B 5-(hydroxymethyl)-2-furfural



C 2-ethylhydroxy-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone



圖十五、以 GC-MS 偵測出含量較高之化合物結構

Figure 15. Higher percentage compounds of GC peak area



## 第六章 討論

### 一、滲透壓與脂質過氧化

滲透壓逆境與氧化有關，氧化之逆境會造成自由基的產生，自由基會造成脂質過氧化，進而產生醛類危害生物體。*GmTP55* 被認為可與醛類反應以及減少脂質過氧化的進行 (Rodrigues, *et al.*, 2006)。*OsALDH7* 不表現會造成 MDA 的增加 (Shin, *et al.*, 2009)。MDA 為油脂氧化之產物之一，可以做為油脂氧化指標 (張 1995)。MDA 具有很高的活性，會與鄰近分子結合產生毒性，促進細胞防禦機制以及解毒機制的進行並提高對於熱以及缺水逆境之抵抗 (Weber *et al.*, 2004)。

從 MDA 含量分析可得黃米含量高於白米，代表黃米之油脂氧化程度比白米高。影響 MDA 的含量可由影響脂質氧化的因素得知，包括脂肪酸不飽和程度、氧氣、光線、溫度與水分等 (張 1995)。由於樣品是由不同之地點收集而來，貯存條件及方式皆非相同，若以相同條件下比較會更佳。

NIOSH (the national institute for occupational safety and health) (<http://www.cdc.gov/niosh/>) 的報告指出，大鼠接觸 MDA 會引發甲狀腺腫瘤以及胰島細胞腫瘤；Crawford 學者 (1965) 指出 MDA 對於大鼠的最低致死劑量 (LD50) 為 632 mg/Kg。黃米含量為 9.46 nmol/g，換算後為  $6.82 \times 10^{-7}$  mg/Kg，故黃米之 MDA 含量並不至於對人體造成傷害。

## 二、黃色成分分析

黃米為新品種，其基本成分與一般米雖然在統計上有顯著之差異，但實際上並未差異太大，兩者皆以碳水化合物為主要成分，水分次之，故 *OsALDH7* 對於基本成分未造成太大影響。

天然黃色色素具有類黃酮、單寧、betalain、醌類、xanthones、類胡蘿蔔素、維生素 B<sub>2</sub>，除了胡蘿蔔素外，其他皆為水溶性物質（張 1995）。本次實驗以吳永培博士提出之疑似成分類胡蘿蔔素以及廣泛存在於植物之成分類黃酮為可能成分做為檢測。

以 70% 甲醇與乙醇分別萃取米粒中之類黃酮素與類胡蘿蔔素，從 TLC 分析中，黃米與白米並未找出差異條帶，若以特殊呈色劑反應，可能可找出差異成分。以 HPLC 分析，黃米之 70% 甲醇萃取液具有不同於白米之波峰，但是以萃取液顏色比較可知它並非黃色物質之主要成分（圖三）。以乙醇萃取，萃取液幾乎為無色，從 HPLC 分析得知白米與黃米未含有類胡蘿蔔素。

針對黃米之黃色物質，起初嘗試以不同比例之甲醇萃取，皆無法將黃色成分完全萃取出，也嘗試以乙酸乙酯、正丁醇等溶劑試圖將黃色物質分離，結果發現黃色物質主要溶於水層。黃色物質可能被包覆於澱粉顆粒內，將澱粉顆粒打開是否會增加黃色物質的萃取效果，澱粉顆粒於水溶液中，加熱會使澱粉進行糊化及增黏作用（張 1995）。糊化為結晶結構被破壞以及澎潤作用；澱粉顆粒分為結晶區及非結晶區，首先於非結晶區進行澎潤作用，接著澎潤區域會對結晶區造成壓力使其變形，最終澱粉顆粒會收縮成隨機線性的形狀（張 1995）。曾經嘗試以 65°C 萃取，其效果較好，但水溶液會形成糊狀，無法過濾，故黃色物質被包覆於澱粉顆粒。

將水萃取之樣品過濾乾燥後回溶於 50% 甲醇，可分成上層液體、下層液體與沉澱。沉澱為澱粉顆粒，上層液體為淡黃色，下層為褐色，液體分層之原因需

要進一步探討。取下層液體以 HPLC 機器，碳-18 管柱分析水萃取物，為了找出黃色物質於何處，將收集之管子乾燥，觀察顏色，確定黃色物質之滯留時間非常短，其波峰可能包含溶劑波峰之疑慮，但以白米和黃米之圖譜比對扣除，便可將溶劑波峰移除。另外圖譜中並沒有單一波峰，此類黃色物質之極性非常類似，需要更改管柱、移動相條件或以其他方法將其分離。曾經嘗試以 NH 管柱分析，NH 管柱一般用以分析醣類成分，與管柱鍵結的越緊密代表 OH 基或其他極性基團越多。以 75% 乙腈為移動相時，無法將其沖提下來，必須以 0.2% 甲酸為移動相，才可將其沖提出，故此類黃色物質具有許多極性基團。由於 NH 管柱必須於酸性條件才可將黃色物質沖提出，為了怕酸性環境會影響成分改變，故選擇利用碳-18 管柱分析。

### 三、分子量與醣類分析

從 HPLC 收集之水萃取樣品經過酒精沉澱後，分為上清液與沉澱，其中上清液為淡黃色，而沉澱為深褐色。分析上述樣品之分子量與醣類組成，沉澱部分需要經過酸水解處理才能分析醣類組成，可以發現黃色物質具有醣基。M48 之上清液之分子量為 1140 左右，移除骨架部分之分子量，約有 4 個醣分子結合於骨架上，且最有可能之醣類為蔗糖。M48 之沉澱分子量為 1000 至 5000，去除骨架後，可能結合之醣類數目為 4 至 27 個醣分子，且最有可能之醣類為果糖。分子量分析的部份，機器限制約 1000 MW，若有小於 1000 MW 之物質無法測得。醣類分析也限於機器限制，只可測得單醣與少數雙醣化合物，故酸水解之效率不高也會影響醣類之分析，由酸水解前與酸水解後之分子量比較，酸水解之條件不夠嚴苛，部分分子之醣基沒有完全切除。

#### 四、揮發性成分分析

分子量及醣類分析皆無法確定其結構骨架為何，故以 GC-MS 分析結構。其中偵測到之結構且含量較多的包括 furfural、5-(hydroxymethyl)-2-furfural 和 2-ethylhydroxy-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone 等。於高溫反應下，許多鍵結都會斷裂，另外偵測到之成分也有可能於高溫下反應，此類結構可能為梅納反應之骨架。所有白米之波峰皆大於黃米，代表黃米之成分由於 OsALDH7 不具有功能，故類物質進一步形成無法以 GC 偵測之物質，另外有些物質因為濃度太低被機器忽略，若先經一些分離步驟，可以將一些相同物質去除，進而找到白米與黃米相異之物質。其中 5-(hydroxymethyl)-2-furfural 被認為有突變的作用 (Friedman 2005 ; Surh *et al.*, 1994)。白米與黃米成分中之 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone, Hiramoto 等學者 (1997) 以醬油為材料，發現 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone 可造成 DNA 的斷裂與突變。

小麥與水稻皆為禾本科作物，小麥之基本成分 (碳水化合物 67%、粗蛋白 16%、粗脂肪 2%、水分 12%和灰分 2%) 與水稻 (黃米) 之基本成分 (碳水化合物 86%、粗蛋白 8%、粗脂肪 0.5%、水分 15%和灰分 0.4%) 都是以碳水化合物之含量最高且皆為糧食作物 (蔡 1994)。以 GC-MS (250°C 10mins) 偵測小麥粉之梅納反應產物，與黃米比對到相同之化合物包括 furfural、5-methylfurfural、2,3-dihydro-5-hydroxy-6-methyl-pyran-4-one 與 2-acetylfuran (Adams *et al.*, 2005)。兩種物種之梅納反應因為提供羰基之化合物成分與比例相似，在高溫裂解下形成部分相同之梅納反應產物。

## 五、梅納反應產物

梅納反應為非酵素性褐變，具有羰基（還原糖）、胺基（胺基酸、胜肽與蛋白質）與水同時存在便會進行，高溫會促進反應之效率（Maillard 1912）。於醣類、蛋白質等代謝中產生之多種醛類具有羰基，故可促進梅納反應之進行（Schauenstein, *et al.*, 1977； Vasiliou and Nebert 2005； Yoshida, *et al.*, 1998）。

黃米之基本成分具有胺基酸、碳水化合物與水，MDA 含量較高，且和醣類鍵結。黃米之黃色物質可能於代謝過程中產生之醛類化合物無法經由 OsALDH7 代謝反應形成酸，而後被植物體代謝，故 MDA 會與鄰近具有胺基之化合物（蛋白質）反應，根據梅納反應路徑形成聚合物，而部分聚合物成分可被 GC-MS 偵測之。

抑制梅納反應之方法為降低儲存溫度、降低水分含量、降低 pH 值等（張 1995）。黃米為生長過程中產生黃色的物質，若種植時降低溫度或使其處於水分含量較少的環境下，可能具有降低黃色色素生成之功用，但是於低溫或降低水分含量之環境，對於植株為一種逆境，會影響生長情形。

## 六、ALDH7

以染色體漫之方法找到黃米的突變基因為 *OsALDH7*。*ALDH7* 普遍存在於動物、植物，但尚未完全了解其扮演之角色，目前發現阿拉伯芥之 *ALDH7*、10、11 和 12 基因於滲透壓逆境時會大量表現 (Kirch, *et al.*, 2004)。將大豆之 *GmTP55* 基因轉殖於阿拉伯芥與菸草中，於缺水、乾燥以及高鹽逆境下會大量表現 (Rodrigues, *et al.*, 2006)。水稻之 *OsALDH7* 基因於種子發育時期，其表現量會隨著天數增加而升高，另外以冷處理、熱處理、鹽處理、乾燥處理以及農藥 (巴拉刈) 處理之幼苗，其表現量會隨著處理時間增長而升高 (Shin, *et al.*, 2009)。人類之 *ALDH7* 於眼睛與腎臟等面臨滲透壓平衡之器官會大量表現 (Skvorak *et al.*, 1997)。由上述實驗結果可證實 *ALDH7* 具有維持滲透壓平衡之功能。

由於實驗進行時，黃米正處於品種命名與專利申請之階段，故我們無法取得植株，僅收集到黃米之去胚精米。為深入了解此基因於水稻表現之情形，故採用黃米之親本台農 67 號，亦即具正常 *ALDH7* 基因之品種，收集發育不同天數之水稻種子、葉子、鹽處理之葉子、ABA 處理之葉子、不同長度之穗、花粉以及癒傷組織。以 RT-PCR 偵測 *OsALDH7* 之表現量，此基因於不同發育期之稻穗大量表現，至水稻授粉後於發育種子會有消長，呈現動態之變動，即增加後減少再增加減少，種子於充實過程中會造成膨壓改變，影響基因表現量 (圖十二)。鹽處理之表現高於 ABA 處理、癒傷組織以及花粉 (圖十三)。不同品種之水稻以及種植環境也會造成基因表現之差異。

## 七、水稻基因家族

水稻有 20 個 *ALDH* 基因，從 MPSS 資料結果發現，*ALDH* 基因於逆境下會大量表現，如：白葉枯病、稻熱病和割傷處理等 (<http://mpss.udel.edu/rice/>)。以 InterProScan 預測 motif，*OsALDH5*、*OsALDH10-1*、*OsALDH10-2* 與 *OsALDH22* 除了尚未定義之 motif，皆包含 *OsALDH7* 之 motif，若表現位置相同，則此 4 個基因可取代 *OsALDH7* 之功能。*OsALDH10-1* 之等電點與分子量和 *OsALDH7* 非常相近，另外使用 *OsALDH7* 序列以 BLAST 做分析，最相近的為 *OsALDH10-1*。此基因為 betaine-aldehyde dehydrogenase，*OsALDH7* 之反應形式可能與其類似。*OsALDH7* 造成黃米之產生，而在植株其他部位上卻沒有發現變異。由 (表十一) 可得在未成熟之米粒中，*OsALDH5*、*OsALDH6*、*OsALDH7*、*OsALDH10-1*、*OsALDH11* 與 *OsALDH12* 會表現，且於細胞表現之部位不同，故 *OsALDH7* 為米粒中無可取代之基因，而其他植株部位因為有其他類似基因可以取代 *OsALDH7* 的表現，故不會被影響。



## 第七章 結論

黃米之黃色物質並不影響一般成分之組成。黃色物質具有很高之極性，需以水萃取且吸光值於 360 nm 左右。經由分子量分析以及醣類分析可以得知此物質與醣類鍵結且分子量不固定。本論文以 prolyzer GC-MS 偵測到之結構可能為黃色物質之骨架結構經高溫反應後所形成，由於材料為白米與黃米粉末，可能造成雜訊太多，無法偵測到黃色物質。本研究結束後，實驗室同仁以管柱分離，收集差異波峰再以 prolyzer GC-MS 偵測，偵測到結構為 1-pentylpyrrole 等含氮之五環化合物，此成分為梅納反應之產物，然而目前不完全了解梅納反應之產物對人體之影響，必須確定為何種化合物才能夠確定是否有益。

分別偵測類黃酮和類胡蘿蔔素之含量，兩種樣品皆不具類胡蘿蔔素，但是以類黃酮分析之條件做分離時，發現有異於白米之波峰，雖然由萃取液可知其並非主要成分，但可以收集其差異波峰，進一步分析可能之結構。

在植物體中，此基因在逆境下會大量表現，可能具有減少有害成分的累積，幫助植物體對抗逆境，抑或是產生抵抗逆境之物質。黃色物質可能為蛋白質喪失功能，造成中間代謝物之累積；抑或是酵素之功能被加強，大量生成產物之結果，亦可能為蛋白質一個胺基酸改變，影響代謝形成其他代謝物之結果。黃色物質生成機制以及對於植物體之影響，需要更進一步的研究。

## 第八章 參考文獻

- 邱輝龍、范明仁。1998。花青素與花色之表現。 *中國園藝* 44(2):102-115。
- 施怡如、鄭統隆、曾東海、王強生。2004。有色水稻中花青素的種類及其功能探討。 *中華農業研究*。 53：221-228。
- 張為憲、李敏雄、呂政義、張永和、孫璐西、陳怡宏、張基郁、顏國欽、林志城、林慶文。1995。食品化學。華香出版社。
- 蔡文福。(1994)。雜糧作物各論。臺灣區雜糧發展基金會。
- 鄭統隆、林素月、曾東海、王強生。2005。水稻直鏈性澱粉突變體快速篩選法。 *台灣農業研究*。54：103~112。
- Adams, A., Borrelli, R. C., Fogliano, V. and De Kimpe, N. (2005) Thermal Degradation Studies of Food Melanoidins *J Agric Food Chem*, 53, 4136-4142.
- Ames, J. M., Wynne, A., Hofmann, A., Plos, S. and Gibson, G. R. (1999) The Effect of a Model Melanoidin Mixture on Faecal Bacterial Populations in Vitro *Br J Nutr*, 82, 489-495.
- An, G. H., Lee, S., Kim, S. H. and Kim, S. R. (2005) Molecular Genetics Using T-DNA in Rice *Plant and Cell Physiology*, 46, 14-22.
- Boeke, J. D., Garfinkel, D. J., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1985) Ty Elements Transpose through an Rna Intermediate *Cell*, 40, 491-500.
- Brands, C. M., Alink, G. M., Van Boekel, M. A. and Jongen, W. M. (2000) Mutagenicity of Heated Sugar-Casein Systems: Effect of the Maillard Reaction *J Agric Food Chem*, 48, 2271-2275.
- Brenner, S., Johnson, M., Bridgham, J., *et al.*, (2000) Gene Expression Analysis by Massively Parallel Signature Sequencing (Mpss) on Microbead Arrays *Nat Biotechnol*, 18, 630-634.
- Burg, M. B., Kwon, E. D. and Kultz, D. (1996) Osmotic Regulation of Gene Expression *FASEB J*, 10, 1598-1606.
- Burkhardt, P. K., Beyer, P., Wunn, J., Kloti, A., Armstrong, G. A., Schledz, M., Von Lintig, J. and Potrykus, I. (1997) Transgenic Rice (*Oryza Sativa*) Endosperm Expressing Daffodil (*Narcissus Pseudonarcissus*) Phytoene Synthase Accumulates Phytoene, a Key Intermediate of Provitamin a Biosynthesis *Plant J*, 11, 1071-1078.
- Chen, S., Jin, W., Wang, M., Zhang, F., Zhou, J., Jia, Q., Wu, Y., Liu, F. and Wu, P. (2003) Distribution and Characterization of over 1000 T-DNA

- Tags in Rice Genome *Plant J*, 36, 105-113.
- Chen, T. H. and Murata, N. (2002) Enhancement of Tolerance of Abiotic Stress by Metabolic Engineering of Betaines and Other Compatible Solutes *Curr Opin Plant Biol*, 5, 250-257.
- Cheng, J. J., Lin, C. Y., Lur, H. S., Chen, H. P. and Lu, M. K. (2008) Properties and Biological Functions of Polysaccharides and Ethanolic Extracts Isolated from Medicinal Fungus, *Fomitopsis Pinicola* *Process Biochemistry*, 43, 829-834.
- Chomczynski, P. (1993) A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of Rna, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples *Biotechniques*, 15, 532-534, 536-537.
- Fedoroff, N., Wessler, S. and Shure, M. (1983) Isolation of the Transposable Maize Controlling Elements Ac and Ds *Cell*, 35, 235-242.
- Fehr, Walter R. (1987) *Principles of Cultivar Development, Vol. 1, Theory and Technique*. 886 Third Avenue New York.: Macmillan Publishing Co.,.
- Finot, P. A. and Magnenat, E. (1981) Metabolic Transit of Early and Advanced Maillard Products *Progress in Food and Nutrition Science*, 5, 193-207.
- Fong, W. P., Cheng, C. H. K. and Tang, W. K. (2006) Antiquitin, a Relatively Unexplored Member in the Superfamily of Aldehyde Dehydrogenases with Diversified Physiological Functions *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 2881-2885.
- Fong, W. P., Cheng, C. H. and Tang, W. K. (2006) Antiquitin, a Relatively Unexplored Member in the Superfamily of Aldehyde Dehydrogenases with Diversified Physiological Functions *Cell Mol Life Sci*, 63, 2881-2885.
- Forbes, J. M., Cooper, M. E., Oldfield, M. D. and Thomas, M. C. (2003) Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy *Journal of the American Society of Nephrology*, 14, S254-S258.
- Friedman, M. (2005) Biological Effects of Maillard Browning Products That May Affect Acrylamide Safety in Food *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*, 561, 135-156.
- Gao, C. and Han, B. (2009) Evolutionary and Expression Study of the Aldehyde Dehydrogenase (Aldh) Gene Superfamily in Rice (*Oryza*

- Sativa) *Gene*, 431, 86-94.
- Granvogl, M., Jezussek, M., Koehler, P. and Schieberle, P. (2004) Quantitation of 3-Aminopropionamide in Potatoes-a Minor but Potent Precursor in Acrylamide Formation *J Agric Food Chem*, 52, 4751-4757.
- Guerrero, F. D., Jones, J. T. and Mullet, J. E. (1990) Turgor-Responsive Gene Transcription and Rna Levels Increase Rapidly When Pea Shoots Are Wilted. Sequence and Expression of Three Inducible Genes *Plant Mol Biol*, 15, 11-26.
- Hare, P. D. and Cress, W. A. (1997) Metabolic Implications of Stress-Induced Proline Accumulation in Plants *Plant Growth Regulation*, 21, 79-102.
- Heath, RI and Packer, L (1968) Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
- Hirochika, H. (1997) Retrotransposons of Rice: Their Regulation and Use for Genome Analysis *Plant Molecular Biology*, 35, 231-240.
- Hodge, J. E. (1953) Dehydrated Foods - Chemistry of Browning Reactions in Model Systems *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 928-943.
- Homma, S. and Fujimaki, M. (1981) Growth Response of Rats Fed a Diet Containing Nondialyzable Melanoidin *Prog Food Nutr Sci*, 5, 209-216.
- Hsing, Y. I., Chern, C. G., Fan, M. J., *et al.*, (2007) A Rice Gene Activation/Knockout Mutant Resource for High Throughput Functional Genomics *Plant Mol Biol*, 63, 351-364.
- Hsu, L. C., Chang, W. C. and Yoshida, A. (1994) Cloning of a Cdna Encoding Human Aldh7, a New Member of the Aldehyde Dehydrogenase Family *Gene*, 151, 285-289.
- Huang, W., Ma, X., Wang, Q., Gao, Y., Xue, Y., Niu, X., Yu, G. and Liu, Y. (2008) Significant Improvement of Stress Tolerance in Tobacco Plants by Overexpressing a Stress-Responsive Aldehyde Dehydrogenase Gene from Maize (*Zea Mays*) *Plant Mol Biol*, 68, 451-463.
- International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP) (2005) The Map-Based Sequence of the Rice Genome *Nature*, 436, 793-800.
- Izawa, T., Ohnishi, T., Nakano, T., *et al.*, (1997) Transposon Tagging in Rice *Plant Molecular Biology*, 35, 219-229.

- Jeong, D. H., An, S., Park, S., *et al.*, (2006) Generation of a Flanking Sequence-Tag Database for Activation-Tagging Lines in Japonica Rice *Plant J*, 45, 123-132.
- Jiang, S. Y., Bachmann, D., La, H., Ma, Z., Venkatesh, P. N., Ramamoorthy, R. and Ramachandran, S. (2007) Ds Insertion Mutagenesis as an Efficient Tool to Produce Diverse Variations for Rice Breeding *Plant Molecular Biology*, 65, 385-402.
- Kirch, H. H., Bartels, D., Wei, Y., Schnable, P. S. and Wood, A. J. (2004) The Aldh Gene Superfamily of Arabidopsis *Trends Plant Sci*, 9, 371-377.
- Kirch, H. H., Nair, A. and Bartels, D. (2001) Novel Aba- and Dehydration-Inducible Aldehyde Dehydrogenase Genes Isolated from the Resurrection Plant *Cratogeomys plantagineum* and Arabidopsis *Thaliana Plant J*, 28, 555-567.
- Kirch, H. H., Schlingensiepen, S., Kotchoni, S., Sunkar, R. and Bartels, D. (2005) Detailed Expression Analysis of Selected Genes of the Aldehyde Dehydrogenase (Aldh) Gene Superfamily in Arabidopsis *Thaliana Plant Mol Biol*, 57, 315-332.
- Kolesnik, I. V., Eliseev, A. A., Malakho, A. P., Garshev, A. V., Tarasov, V. P., Lukashin, A. V. and Tret'yakov, Y. D. (2004) Synthesis of Aluminum-Rich Mesoporous Aluminosilicates *Doklady Chemistry*, 395, 78-81.
- Kotchoni, S. O., Kuhns, C., Ditzer, A., Kirch, H. H. and Bartels, D. (2006) Over-Expression of Different Aldehyde Dehydrogenase Genes in Arabidopsis *Thaliana* Confers Tolerance to Abiotic Stress and Protects Plants against Lipid Peroxidation and Oxidative Stress *Plant Cell Environ*, 29, 1033-1048.
- Lee, T. C. and Chichester, C. O. (1983) Physiological, Toxicological, and Nutritional Aspects of Various Maillard Browning Proteins *Acs Symposium Series*, 234, 379-408.
- Lindahl, R. (1992) Aldehyde Dehydrogenases and Their Role in Carcinogenesis *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 27, 283-335.
- Liu, F., Cui, X. Q., Horner, H. T., Weiner, H. and Schnable, P. S. (2001) Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Activity Is Required for Male Fertility in Maize *Plant Cell*, 13, 1063-1078.

- Lutts, S., Kinet, J. M. and Bouharmont, J. (1995) Changes in Plant Response to NaCl During Development of Rice (*Oryza Sativa* L) Varieties Differing in Salinity Resistance *Journal of Experimental Botany*, 46, 1843-1852.
- Maillard, L.C. (1912) Maillard, Action Des Acides Amines Sur Les Sucres Formation Des Melanoidines Par Voie Methodique *Council of Royal Academy Science Series 2*, 154, 66-68.
- Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F. and Van Boekel, M. A. J. S. (2000) A Review of Maillard Reaction in Food and Implications to Kinetic Modelling *Trends in Food Science & Technology*, 11, 364-373.
- Mei, W., Lei, J., Xu, Y., Wei, G. and Zhu, Y. (2007) Characterization of Three Arabidopsis Ap2/Erbp Family Transcription Factors Involved in Aba Sensitivity, Freeze and Salt Tolerance *Chinese Science Bulletin*, 52, 1746-1753.
- Mendiola, J. A., Marin, F. R., Senorans, F. J., Reglero, G., Martin, P. J., Cifuentes, A. and Ibanez, E. (2008) Profiling of Different Bioactive Compounds in Functional Drinks by High-Performance Liquid Chromatography *J Chromatogr A*, 1188, 234-241.
- Miyao, A., Tanaka, K., Murata, K., Sawaki, H., Takeda, S., Abe, K., Shinozuka, Y., Onosato, K. and Hirochika, H. (2003) Target Site Specificity of the Tos17 Retrotransposon Shows a Preference for Insertion within Genes and against Insertion in Retrotransposon-Rich Regions of the Genome *Plant Cell*, 15, 1771-1780.
- Nair, R. B., Bastress, K. L., Ruegger, M. O., Denault, J. W. and Chapple, C. (2004) The Arabidopsis Thaliana Reduced Epidermal Fluorescence1 Gene Encodes an Aldehyde Dehydrogenase Involved in Ferulic Acid and Sinapic Acid Biosynthesis *Plant Cell*, 16, 544-554.
- Ohta, H., Shida, K., Peng, Y. L., Furusawa, I., Shishiyama, J., Aibara, S. and Morita, Y. (1990) The Occurrence of Lipid Hydroperoxide-Decomposing Activities in Rice and the Relationship of Such Activities to the Formation of Antifungal Substances *Plant and Cell Physiology*, 31, 1117-1122.
- Potrykus, I. (2001) Golden Rice and Beyond *Plant Physiol*, 125, 1157-1161.
- Reddy, V. S., Dash, S. and Reddy, A. R. (1995) Anthocyanin Pathway in Rice (*Oryza-Sativa* L) - Identification of a Mutant Showing Dominant

- Inhibition of Anthocyanins in Leaf and Accumulation of Proanthocyanidins in Pericarp *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 301-312.
- Rodrigues, S. M., Andrade, M. O., Gomes, A. P., Damatta, F. M., Baracat-Pereira, M. C. and Fontes, E. P. (2006) Arabidopsis and Tobacco Plants Ectopically Expressing the Soybean Antiquitin-Like Aldh7 Gene Display Enhanced Tolerance to Drought, Salinity, and Oxidative Stress *J Exp Bot*, 57, 1909-1918.
- Ryu, S. N., Park, S. Z. and Ho, C. T. (1998) High Performance Liquid Chromatographic Determination of Anthocyanin Pigments in Some Varieties of Black Rice *Journal of Food and Drug Analysis*, 6, 729-736.
- Sallaud, C., Gay, C., Larmande, P., *et al.*, (2004) High Throughput T-DNA Insertion Mutagenesis in Rice: A First Step Towards in Silico Reverse Genetics *Plant J*, 39, 450-464.
- Sato, Y., Sentoku, N., Miura, Y., Hirochika, H., Kitano, H. and Matsuoka, M. (1999) Loss-of-Function Mutations in the Rice Homeobox Gene Osh15 Affect the Architecture of Internodes Resulting in Dwarf Plants *EMBO J*, 18, 992-1002.
- Schauenstein, E., Esterbauer, H. and Zollner, H. (1977) Aldehydes in Biological Systems: Their Natural Occurrence and Biological Activities. *Pion, London*.
- Shin, J. H., Kim, S. R. and An, G. (2009) Rice Aldehyde Dehydrogenase7 Is Needed for Seed Maturation and Viability *Plant Physiology*, 149, 905-915.
- Skibbe, D. S., Liu, F., Wen, T. J., Yandea, M. D., Cui, X., Cao, J., Simmons, C. R. and Schnable, P. S. (2002) Characterization of the Aldehyde Dehydrogenase Gene Families of Zea Mays and Arabidopsis *Plant Mol Biol*, 48, 751-764.
- Skog, K. I., Johansson, M. A. and Jagerstad, M. I. (1998) Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and Intake *Food Chem Toxicol*, 36, 879-896.
- Skvorak, A. B., Robertson, N. G., Yin, Y., *et al.*, (1997) An Ancient Conserved Gene Expressed in the Human Inner Ear: Identification, Expression Analysis, and Chromosomal Mapping of Human and Mouse Antiquitin (Atq1) *Genomics*, 46, 191-199.

- Somoza, V. (2005) Five Years of Research on Health Risks and Benefits of Maillard Reaction Products: An Update *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 663-672.
- Sophos, N. A. and Vasiliou, V. (2003) Aldehyde Dehydrogenase Gene Superfamily: The 2002 Update *Chem Biol Interact*, 143-144, 5-22.
- Surh, Y. J., Liem, A., Miller, J. A. and Tannenbaum, S. R. (1994) 5-Sulfooxymethylfurfural as a Possible Ultimate Mutagenic and Carcinogenic Metabolite of the Maillard Reaction-Product, 5-Hydroxymethylfurfural *Carcinogenesis*, 15, 2375-2377.
- Takashi Matsumoto, Jianzhong Wu<sup>1</sup>, Hiroyuki Kanamori<sup>1</sup>, Yuichi, Katayose<sup>1</sup>, Masaki Fujisawa<sup>1</sup>, Nobukazu Namiki<sup>1</sup>, Hiroshimizuno<sup>1</sup>, Kimiko Yamamoto<sup>1</sup>, Baltazar A. Antonio<sup>1</sup>, Tomoya Baba<sup>1</sup>, Katsumi Sakata<sup>1</sup>, Yoshiaki Nagamura<sup>1</sup>, Hiroyoshi Aoki<sup>1</sup>, Koji Arikawa<sup>1</sup>, Kohei Arita<sup>1</sup>, Takahito Bito<sup>1</sup>, Yoshino Chiden<sup>1</sup>, Nahoko Fujitsuka<sup>1</sup>, Rie Fukunaka<sup>1</sup>, Masao, *et al.*, (2005) The Map-Based Sequence of the Rice Genome *Nature*, 436, 793-800.
- Taylor, J. L., Demyttenaere, J. C., Abbaspour Tehrani, K., *et al.*, (2004) Genotoxicity of Melanoidin Fractions Derived from a Standard Glucose/Glycine Model *J Agric Food Chem*, 52, 318-323.
- Tsuji, H., Meguro, N., Suzuki, Y., Tsutsumi, N., Hirai, A. and Nakazono, M. (2003) Induction of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase by Submergence Facilitates Oxidation of Acetaldehyde During Re-Aeration in Rice *FEBS Lett*, 546, 369-373.
- Vasiliou, V. and Nebert, D. W. (2005) Analysis and Update of the Human Aldehyde Dehydrogenase (Aldh) Gene Family *Hum Genomics*, 2, 138-143.
- Vasiliou, V., Pappa, A. and Estey, T. (2004) Role of Human Aldehyde Dehydrogenases in Endobiotic and Xenobiotic Metabolism *Drug Metabolism Reviews*, 36, 279-299.
- Vasiliou, V., Pappa, A. and Petersen, D. R. (2000) Role of Aldehyde Dehydrogenases in Endogenous and Xenobiotic Metabolism *Chemico-Biological Interactions*, 129, 1-19.
- Vlassara, H., Cai, W., Crandall, J., Goldberg, T., Oberstein, R., Dardaine, V., Peppas, M. and Rayfield, E. J. (2002) Inflammatory Mediators Are Induced by Dietary Glycotoxins, a Major Risk Factor for Diabetic Angiopathy *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15596-15601.



- Weber, H., Chetelat, A., Reymond, P. and Farmer, E. E. (2004) Selective and Powerful Stress Gene Expression in Arabidopsis in Response to Malondialdehyde *Plant J*, 37, 877-888.
- Weretilnyk, E. A. and Hanson, A. D. (1990) Molecular Cloning of a Plant Betaine-Aldehyde Dehydrogenase, an Enzyme Implicated in Adaptation to Salinity and Drought *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2745-2749.
- Wilkinson, J. and Clapper, M. L. (1997) Detoxication Enzymes and Chemoprevention *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 216, 192-200.
- Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. and Potrykus, I. (2000) Engineering the Provitamin a (Beta-Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm *Science*, 287, 303-305.
- Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L. C. and Chang, C. (1998) Human Aldehyde Dehydrogenase Gene Family *Eur J Biochem*, 251, 549-557.

# 第九章 附錄

附圖一、Hodge 學者建立之梅納反應模型 (Hodge 1953)

