

بررسی تأثیر جوانه‌زدن بر ترکیبات فنولیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و غلظت گاما آمینوبوتیریک اسید در واریته‌های مختلف برنج قهوه‌ای ایرانی

سیما شکری قلعه^۱، سولماز صارم نژاد^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۳۰)

چکیده

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر جوانه‌زدن بر ویژگی‌های تغذیه‌ای و فراسودمند ارقام مختلف برنج قهوه‌ای ایرانی بود. بدین منظور سه رقم اصلاح شده‌ی (فجر، شیرودی، ندا) و یک رقم بومی (طارم) انتخاب و پس از ۲۴ ساعت خیساندن به مدت ۲۴ ساعت رویانده شد. ارقام مورد بررسی از نظر میزان غلظت گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا)، ترکیبات فنولیک آزاد و باند شده و قدرت مهار رادیکال DPPH (۲ و ۱- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل)، مربوط به آن‌ها مورد آزمون قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله فرایند جوانه‌زدن سبب افزایش معنی‌دار میزان گابا شد ($p < 0.05$)، (به جز رقم بومی طارم). همچنین میزان ترکیبات فنولیک آزاد تحت تأثیر جوانه‌زدن کاهش معنی‌داری یافت. این کاهش در مورد میزان ترکیبات فنولیک باند شده در نمونه‌های ندا و فجر پس از جوانه‌زدن نیز مشاهده شد ولی رقم شیرودی تحت تأثیر فرایند جوانه‌زنی افزایش معنی‌دار ترکیبات فنولیک باند شده را نشان داد. بررسی تأثیر جوانه‌زدن بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارقام مورد مطالعه بیانگر افت معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک آزاد بود ولی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به ترکیبات فنولیک باند شده (به جز رقم ندا) تأثیر معنی‌داری نداشت. براساس نتایج به دست آمده هر یک از ارقام مورد مطالعه را بر حسب ویژگی خاص خود می‌توان برای غنی‌سازی مواد غذایی و تولید فرآورده‌های غذایی فراسودمند به کار برد.

کلید واژگان: برنج قهوه‌ای، جوانه‌زدن، گابا، فراسودمند، ترکیبات فنولیک

*مسئول مکاتبات: Saremnezhad@gmail.com

۱- مقدمه

برنج گیاهی یکساله، علفی و ساقه آن همانند گندم، بند و بند و تو خالی با ارتفاع حداکثر ۱/۵ متر می‌باشد. این گیاه از جنس *Oryza* و دارای ۲۳ گونه است که فقط دو گونه *Oryza sativa* (آسیا، اروپا، آمریکا، ایران) و *Oryza glabrima* در جنوب آفریقا کشت می‌شود. حدود ۹۵٪ تولید برنج جهان در چین، هند و آسیای جنوب شرقی است و مهمترین منبع غذایی بیش از یک سوم جمعیت جهان را تشکیل می‌دهد [۱]. برنج قهوه‌ای جوانه زده یا *GBR* یک ماده غذایی فراسودمند است. دارای نرخ هضم و جذب بالایی است و حاوی مواد مغذی نظیر گاما آمینو بوتیریک اسید (*GABA*) و فرولیک اسید در مقادیر چندبرابر برنج قهوه‌ای معمولی است. *GBR* دارای طعم شیرین‌تر از برنج قهوه‌ای بوده و بافت و قابلیت پخت بهتری دارد. و میزان لیزین، ویتامین *E*، نیاسین، منیزیم، ویتامین *B1*، *B6*، گاما اوریزانول و مهار کننده پرولیل اندوپپتیداز بالاتری دارد [۲].

جوانه‌زنی، تکنولوژی ای کم هزینه می‌باشد که با جذب آب توسط دانه شروع می‌شود و بایرون زدن ریشه چه خاتمه می‌یابد. در طول فرایند جوانه‌زنی فعالیت مجدد متابولیسمی رخ می‌دهد که منجر به هیدرولیز پروتئین و کربوهیدرات و سنتز و تجمع متابولیت‌هایی می‌شوند که خصوصیات سلامت بخشی دارند. درجه حرارت، نقطه کلیدی به منظور جوانه‌زنی دانه برنج قهوه‌ای می‌باشد [۳]. کیفیت فیزیکی و شیمیایی دانه‌ها و تجمع ترکیبات زیست فعال در طول جوانه‌زنی وابسته به چندین عامل مانند ژنوتیپ، شرایط خیساندن و جوانه‌زنی (*pH*)، هوادهی محلول که خیساندن در آن صورت می‌گیرد، درجه حرارت و زمان فرایند جذب آب) می‌باشد [۳]. ترکیبات تغذیه‌ای برنج قهوه‌ای عمدتاً در جوانه و سبوس قرار دارند که در اثر فرایند آسیاب کردن یا پولیش نمودن حذف می‌شود [۴]. به همین دلیل برنج قهوه‌ای نسبت به برنج سفید کیفیت تغذیه‌ای بهتری دارد. تحقیقات اخیر نشان داده که مصرف برنج قهوه‌ای سبب کاهش ریسک ابتلا به دیابت نوع ۲، بیماری‌های قلبی و عروقی و سرطان می‌گردد و این اثرات سلامتی بخش مربوط به حضور ترکیبات زیست فعال مثل پلی فنول‌ها، گابا، استریل بتا گلوکوزیدهای آسیله شده و گاما اوریزانول می‌باشد [۵]. گابا دارای اثرات سلامتی بخشی نظیر تنظیم میزان فشارخون و

ضربان قلب، کاهش میزان درد و استرس بوده و سبب خواب‌آلودگی می‌گردد [۶]. عصاره‌ی برنج قهوه‌ای جوانه زده حاوی مقادیر بالای گابا، سلول‌های ایمنی بدن را تحریک کرده و جلوی تکثیر سلول‌های سرطانی را می‌گیرد [۸۰۷]. بر اساس نتایج تحقیقات اخیر، گابا سبب ترشح انسولین در پانکراس شده و می‌تواند از بروز دیابت ممانعت کند [۹]. کاپه‌ها و تسوکارا (۲۰۰۰) به این نتیجه رسیدند که مصرف مداوم *GBR* برای جلوگیری از سردرد، رفع یبوست، پیشگیری از سرطان کولون، تنظیم سطح قند خون و جلوگیری از بیماری‌های قلبی مفید است [۱۰]. برندمیلر و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیان کردند که رژیم‌های غذایی، دارای اهمیت بیشتری در مدیریت دیابت نوع ۲ نسبت به داروها می‌باشند. افزایش محتوای ترکیبات زیست فعال حین جوانه‌زنی برنج قهوه‌ای به طور سینرژیستی اثر کارکردی بهتری نسبت به هر کدام از ترکیبات مغذی موجود در برنج قهوه‌ای جوانه زده به تنهایی دارد، یعنی زمانی که برنج قهوه‌ای جوانه زده به عنوان یک غذای کامل مصرف شود ترکیبات گاما آمینوبوتیریک اسید، گاما اوریزانول، ترکیبات فنولیک و دیگر ترکیبات زیست فعال در برنج قهوه‌ای جوانه زده دارای اثر بخشی بهتری نسبت به هر یک از این ترکیبات به تنهایی می‌باشد [۱۱]. هیروشی (۲۰۰۵) نشان داد که علاوه بر سایر ترکیبات مفید، *GBR* به طور عمده شامل *GABA*، انتقال دهنده عصبی که در مغز و نخاع به وفور یافت می‌شود و فیبر رژیمی که حرکات دودی روده را فعال می‌کند می‌باشد. همچنین *GBR* شامل مقادیر قابل توجهی فیتیک اسید با فعالیت ضد سرطانی قوی و مهارکننده فعالیت پرولیل اندوپپتیداز مربوط به سوخت و ساز پپتید است [۱۲]. جیامیانگوئن و اورایکول (۲۰۰۸) گزارش دادند که جوانه‌زنی بر بافت برنج پخته شده در صورتیکه برنج در دوره‌ای طولانی خیسانده شده باشد اثر بهتری دارد. برنج جوانه‌زده نیاز به زمان پخت کمتر دارد و جذب آب توسط دانه در طول جوانه‌زنی باعث افزایش اندازه آن می‌شود. همچنین برنج جوانه‌زده پخته شیرین‌تر، نرم‌تر، متورم‌تر و منسجم‌تر از برنج قهوه‌ای معمولی پخته است [۱۳]. مطالعات کاکرس و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بهینه نمودن شرایط جوانه‌زنی میزان ترکیبات فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برنج قهوه‌ای اکوادور به حداکثر رسانده شد. بر اساس نظر این محققین کیفیت فراسودمند *GBR* وابسته به ژنوتیپ و شرایط جوانه‌زنی است. حداکثر میزان *GABA* و

دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتیگراد در رطوبت نسبی ۹۵-۹۰٪ به منظور جوانه‌زدن قرار داده شدند. دانه‌های جوانه‌زده در آون ۵۰ درجه سانتیگراد تا رسیدن به رطوبت ۱۰٪ خشک شد. جوانه دانه‌ها جدا شد و در ادامه دانه‌ها آسیاب شد و با الک ۱۰۰مش، الک شد و تا زمان آزمون در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا نگهداری شد [۱۶].

۲-۳- آنالیز ترکیبات شیمیایی

۲-۳-۱- روش اندازه‌گیری میزان گاما آمینو بوتیریک اسید

یک گرم از آرد برنج قهوه‌ای جوانه‌زده با ۵ سی‌سی آب مقطر در ۱۲۵ rpm به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد، سپس در ۸۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصل از سانتریفیوژ در ۴۰ میکرولیتر از محلول اتانول (۲): آب (۲): تری اتیل آمین (۱) حل شد. ۶۰ میکرولیتر از محلول اتانول (۷): آب (۱) و تری اتیل آمین (۱) و فنیل ایزوتیوسیانات (۱) اضافه شد و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و با صافی ۰/۴۵ μm صاف شد و آنالیز با HPLC به طریق زیر انجام شد:

ستون LC-*RP-I8(GP 250-4.6, 5.1m)*، پمپ

10AD، دتکتور *UV-visible* در ۲۵۴ نانومتر

حلال A: سدیم استات ۱/۴ ml، ۰/۱ درصد تری اتیل آمین و ۶ درصد استونیتریل (pH=6.1)
حلال B: ۶۰ درصد استونیتریل
شستشو ستون با گرادیان خطی ۱۰۰-۰ درصد با دبی یک میلی لیتر در دقیقه با حلال B به مدت ۵۰ دقیقه انجام شد. *GABA* استاندارد به عنوان کنترل و برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد. همه آزمایشات در سه تکرار انجام شد [۱۵].

۲-۳-۲- روش استخراج و اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک آزاد از آرد برنج

جهت رسم منحنی استاندارد گالیک اسید، ۰/۵ گرم گالیک اسید توزین شد. ۱۰ میلی لیتر اتانول اضافه شده و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. (با درب بسته تا یک هفته در یخچال قابل نگه داری بود). برای رسم منحنی کالیبراسیون مقادیر ۰، ۱، ۲، ۳، ۵ و ۱۰ میلی لیتر از استوک برداشته شد و داخل بالن ژوژه ۱۰۰ سی‌سی به حجم رسانده شد به این ترتیب

فعالیت آنتی اکسیدانی در جوانه‌زنی برنج قهوه‌ای در شرایط ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت به دست آمد در حالیکه بالاترین میزان ترکیبات فنولی کل در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت جوانه‌زنی در واریته‌های مورد بررسی حاصل شد [۳]. چین‌ما و همکاران در سال ۲۰۱۵ افزایش پروتئین، منیزیم، فسفر، پتاسیم و ویژگی‌های آنتی اکسیدانی آرد برنج بعد از ۴۸ ساعت جوانه‌زنی و کاهش فیتیک اسید و میزان نشاسته کل را گزارش نمودند [۱۴]. چن و همکاران در سال ۲۰۱۶ برنج قهوه‌ای را تحت تأثیر ۱ تا ۳ کیلو ولت پلاسمای کم فشار به مدت ۱۰ دقیقه قرار دادند که اینکار سبب افزایش درصد جوانه‌زنی، طول جوانه و میزان جذب آب در دانه‌ها شد. تیمار ۳ کیلو ولت به مدت ۱۰ دقیقه بهترین نتایج را داشت. در جوانه‌زنی برنج قهوه‌ای فعالیت α آمیلاز به طور معنی داری بالاتر از نمونه‌ی شاهد بود. پلاسمای کم فشار همچنین سبب افزایش میزان *GABA* و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد [۱۵].

با توجه به ارزش غذایی بسیار بالای غلات جوانه زده و اهمیت مصرف آنها، هدف از انجام تحقیق حاضر تعیین اثر فرایند جوانه‌زنی بر میزان ترکیبات فراسودمند واریته‌های مختلف برنج قهوه‌ای ایرانی می باشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد اولیه

شالیهای برنج از ۴ واریته مختلف که عبارت بودند از: طارم، شیرودی، ندا و فجر از مرکز تحقیقات برنج استان مازندران تهیه شدند. ترکیبات شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان و سیگما آمریکا خریداری شد.

۲-۲- جوانه زنی

بعد از پوست‌گیری از شالی واریته‌های مورد نظر، دانه‌های برنج قهوه‌ای با استفاده از آب مقطر شسته و سطح آن به وسیله سدیم هیپوکلریت به مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی شد، سپس دانه‌ها به منظور خشی کردن pH با استفاده از آب مقطر استریل شسته شدند [۳].

برنج قهوه‌ای در دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در آب (نسبت دانه به آب ۱:۵ W/V) خیسانده شد. هر چهار ساعت یکبار آب برنج‌ها تعویض شد و سپس دانه‌ها با دو لایه پارچه نخی پوشانده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در

شد و به مدت ۹۰ دقیقه روی هم‌زن مغناطیسی هم زده شد. جهت تهیه نمونه کنترل در شرایط مشابه فقط از ۱۰۰ میکرولیتر اتانول و ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول DPPH استفاده شد. سپس جذب نمونه‌ها در ۵۱۵ نانومتر در دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. تمام آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد [۱۹،۱۸]. جهت محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی از فرمول زیر استفاده شد.

$$100 \times [\text{جذب کنترل} / \text{جذب نمونه}] - 1 = \text{ظرفیت آنتی‌اکسیدانی}$$

۵-۳-۲- روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها و همگن بودن واریانس‌ها توسط آزمون Levene داده‌های حاصل از انجام آزمایشات به روش تجزیه واریانس یکطرفه آنالیز شد و مقایسه بین میانگین‌های هر ویژگی به روش دانکن در بین واریته‌های مختلف در سطح معنی $p = 0.05$ مورد بررسی قرار گرفت. تمامی آنالیزها با نرم افزار SPSS صورت پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- میزان گاما آمینو بوتیریک اسید

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود رقم‌های شیرودی، ندا و فجر پس از فرایند جوانه زنی محتوای گابای بالاتری نسبت به دانه‌های جوانه زده‌ی خود داشتند. نکته‌ی جالب توجه بالاتر بودن میزان گابا در برنج قهوه‌ای طارم جوانه زده نسبت به طارم جوانه زده است. تجزیه و تحلیل آماری بیانگر تفاوت معنی‌دار میزان گابا در نمونه‌های کنترل نسبت به جوانه‌زده ($p < 0.05$) در هر رقم می‌باشد. نتایج محققین مختلف در مورد مکانیسم تولید گابا بیانگر آغاز تجمع گابا در دانه طی فرایند خیساندن و ادامه یافتن این تجمع در طی جوانه زدن می‌باشد. بر اساس نظر شلپ و همکاران در سال ۲۰۱۲ فرایند خیساندن سبب تحریک فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD) می‌شود. فعالیت این آنزیم در طول زمان رویاندن دانه افزایش می‌یابد. آنزیم GAD سبب کاتالیز نمودن فرایند گاما دکربوکسیلاسیون ال-گلوتامیک اسید به دی‌اکسید کربن و گابا می‌شود. همچنین اخیراً گزارش شده که گابا قابلیت تولید از پوترسین در پاسخ به برخی تنش‌ها را داراست [۲۰].

غلظت‌های ۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم برلیتر گالیک اسید حاصل شد و منحنی استاندارد گالیک اسید توسط خواندن جذب محلولها در طول موج ۷۶۵ nm در اسپکتروفتومتر رسم شد [۱۷].

جهت استخراج و اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولیک آزاد، ابتدا ۱ گرم از آرد برنج با ۱۰ سی‌سی اتانول ۸۰ درصد مخلوط و پس از نیم ساعت هم زدن در دور 4000 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصل برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک آزاد استفاده شد. ۵۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت حاصله با ۲/۵ سی‌سی فولین سیو کالتو مخلوط و محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه با همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس ۲ سی‌سی محلول سدیم کربنات ۷/۵ درصد به آن اضافه و مجدداً به مدت نیم ساعت هم زده شد. تمام موارد فوق در سه تکرار انجام شد و پس از اتمام این مدت جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر مری - فرابنفش (Philler Scientific, USA) خوانده شد [۱۵].

۲-۳-۳- روش استخراج و اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک باند شده

به رسوب حاصل از سانتریفیوژ مرحله قبل ۱۲ سی‌سی از محلول سود ۴ مولار اضافه شد و به مدت یک ساعت هم زده شد، سپس به مدت ۵ دقیقه با دور 4000 rpm سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصله به عنوان محتوای ترکیبات فنولیک باند شده برای اندازه‌گیری غلظت این ترکیبات تا زمان آزمون در فریزر در تاریکی نگه داشته شد. ۵۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت تهیه شده به همراه ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیو کالتو، در حالی که سربشر با فویل پوشانده شده بود به مدت ۵ دقیقه روی هم‌زن مغناطیسی مخلوط، سپس ۲ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه دیگر به همراه مگنت روی هم‌زن مغناطیسی هم زده شد. تمام موارد فوق در سه تکرار انجام شد. پس از اتمام زمان ۳۰ دقیقه جذب در دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد [۱۵].

۲-۳-۴- روش اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

۳/۹ سی‌سی از محلول DPPH ۰/۰۷۵ میلی مولار به ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت تهیه شده حاوی ترکیبات فنولیک آزاد یا باند شده اضافه شد، اطراف بشرها با فویل آلومینیوم پوشانده

در تحقیق دیگری که توسط چن و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شد این محققین از پلاسمای کم فشار برای افزایش میزان ترکیبات فراسودمند برنج قهوه‌ای جوانه زده استفاده کردند. بر اساس گزارش این محققین میزان گابا به طور معنی‌داری در برنج‌های جوانه زده تیمار شده با پلاسمای کم فشار افزایش پیدا کرد و بیشترین میزان گابا در تیمار پلاسمای کم فشار اعمال شده در ولتاژ ۳ کیلو ولت مشاهده شد [۱۵]. در تحقیق حاضر ارقام شیرودی، ندا و فجر پس از فرایند جوانه‌زنی محتوای گابای بالاتری نسبت به دانه‌های جوانه‌زده خود دارا بودند اما رقم طارم افت میزان گابا در اثر جوانه زدن را نشان داد که خلاف گزارشات سایر محققین است.

بالاترین میزان گابا مربوط به رقم شیرودی پس از جوانه زنی با مقدار ۲۱/۰۴ میلی گرم / ۱۰۰ گرم ماده خشک می‌باشد. این در حالیست که بالاترین میزان گابای به دست آمده پس از تیمار پلاسمای کم فشار ۳ کیلو ولت رقم هیبرید برنج قهوه‌ای ژاپونیکا به نام *Taikeng 9 (TK9)*، ۲۸/۱ میلی گرم / ۱۰۰ گرم ماده خشک توسط چن و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش شده است [۱۵]. همچنین کاکرس و همکاران در سال ۲۰۱۴ بالاترین میزان گابا در طی خیساندن در ۲۸C به مدت ۲۴ ساعت را در یکی از ارقام برنج قهوه‌ای اکوادور ۱۶/۶۹ میلی گرم / ۱۰۰ گرم ماده خشک به دست آوردند [۳].

۲-۳- میزان ترکیبات فنولیک

ترکیبات فنولیک یکی از فراوان‌ترین گروه‌های فیتوشیمیایی فعال در برنج قهوه‌ای است که در فرم‌های آزاد و باند شده نامحلول وجود دارد [۲۳]. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد نسبت ترکیبات فنولیک باند شده به ترکیبات فنولیک کل در تمامی ارقام چه شاهد و چه جوانه‌زده بیش از این نسبت برای ترکیبات فنولیک آزاد می‌باشد. بالاترین نسبت ترکیبات فنولیک آزاد به کل مربوط به رقم ندای جوانه‌زده و بیشترین نسبت ترکیبات فنولیک باند شده به کل مربوط به رقم طارم جوانه‌زده می‌باشد. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که به جز رقم ندا در بقیه ارقام فرایند جوانه‌زنی سبب کاهش نسبت ترکیبات فنولیک آزاد به کل و افزایش نسبت ترکیبات فنولیک باند شده به کل شده است.

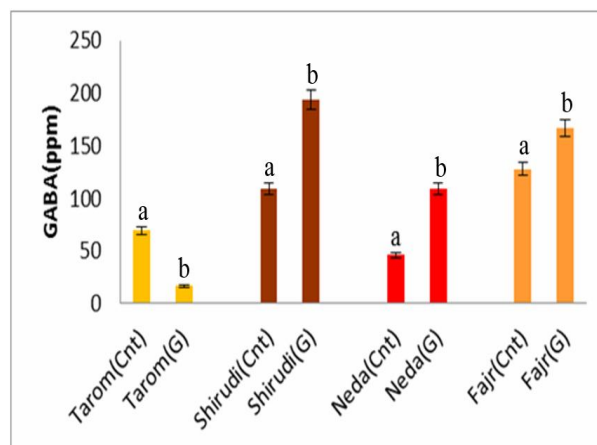


Fig 1 Variation of GABA concentration in different Iranian brown rice cultivars before (cnt) & after germination (G). (Different letters indicate a significant difference $\alpha = 0.05$ between germinated & ungerminated forms of each cultivar)

با توجه به اینکه در تحقیق حاضر از ارقام طارم، شیرودی، ندا و فجر استفاده شده و بجز رقم طارم که یک رقم بومی ایران است بقیه‌ی رقم‌ها اصلاح شده می‌باشند، به نظر می‌رسد دستکاری در خلوص ژنتیکی ارقام مورد اشاره جهت بدست آوردن رقمی با عملکرد کمی و کیفی بالا سبب ایجاد تغییراتی در میزان فعالیت آنزیم *GAD* شده باشد. با توجه به مکانیسم ذکر شده برای تولید گابا احتمال می‌رود رقم طارم محلی در حالت جوانه‌زده به دلایل مختلف که نیاز به تحقیقات بیشتر می‌باشد دچار افت فعالیت *GAD* گشته و یا به طور کلی فرایند جوانه‌زنی به علل مختلف سبب کاهش غلظت گلوتامیک اسید دانه شده است. البته تفاوت میزان گابا در واریته‌های مختلف توسط سایر محققین نیز تأیید شده است. مثلاً متفاوت بودن میزان تجمع گابا در طی خیساندن ۱۰ واریته برنج توسط ساعی کوسا، هورینو و موری (۱۹۹۴) گزارش شده است [۲۱]. تحقیقات بسیاری به افزایش میزان گابا تحت تأثیر جوانه زنی اشاره نموده‌اند. به طور مثال کایاهاارا و توسکاهاارا در سال ۲۰۰۰ مقدار گابا در برنج قهوه‌ای جوانه زده را ۱۰ برابر میزان این ترکیب در برنج سفید و ۲ برابر مقدار آن در برنج قهوه‌ای گزارش نمودند [۱۰]. همچنین چوئی و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش نمودند که رویاندن برنج قهوه‌ای به مدت ۲۴ ساعت سبب افزایش ۷/۹۷ برابری گابا باشد [۲۲].

Table 1 The ratio of free and bound to total phenolics contents in different cultivars

Rice cultivar	Free phenolics / Total phenolics (%)	Bound phenolics / Total phenolics (%)
Tarom (non G)	28.88 a	71.11 a
Tarom (G)	17.06 b	82.93 b
Shirudi (non G)	22.24 c	77.75 c
Shirudi (G)	18.94 d	81.05 d
Neda (non G)	29.19 a	70.80 a
Neda (G)	32.51 a	67.48 a
Fajr (non G)	27.03 f	72.96 f
Fajr (G)	26.27 g	73.72 f

Different letters in each column indicate on significant difference ($p < 0.05$) among samples.

جوانه زدن برنج قهوه‌ای حاکی از تبدیل احتمالی این دو نوع فرم ترکیبات فنولیک به یکدیگر می‌باشد. در این تحقیق میزان کاهش ترکیبات فنولیک آزاد به اندازه میزان افزایش ترکیبات فنولیک باند شده نمی‌باشد. با توجه به اینکه بر اساس گزارشات ارائه شده توسط برخی محققین فرایند جوانه‌زنی سبب افزایش میزان ترکیبات فنولیک آزاد و کاهش ترکیبات فنولیک باند شده می‌گردد [۲۶]، ولی در این تحقیق نتایج متفاوتی حاصل شد. تی و همکاران (۲۰۱۴) آزاد شدن فنولیک‌های باند را به تجزیه‌ی این ترکیبات توسط آنزیم‌های سنتز شده در طی جوانه‌زنی نسبت دادند و همچنین دلیل دیگر افزایش میزان فنولیک‌های آزاد را مربوط به پاسخ گیاه در برابر تیمار جوانه‌زنی دانستند. بدیهی است که با توجه به نتایج کاملاً متضاد این تحقیق حاضر دلایل ارائه شده توسط این محققین در مورد واریته‌های ایرانی مورد بررسی صادق نیست. یکی از دلایل ارائه شده در مورد افزایش میزان ترکیبات فنولیک باند توسط تی و همکاران (۲۰۱۴) به پلیمریزاسیون و اکسیداسیون ترکیبات فنولیک نسبت داده شده است. همچنین آن‌ها از دیگر دلایل افزایش ترکیبات فنولیک را مربوط به تغییرات آنزیم‌های مداخله کننده در سنتز و تجزیه‌ی ترکیبات فنولیک آزاد یا باند شده نسبت دادند. با فرض درست در نظر گرفتن فرضیه‌ی فوق به نظر می‌رسد علت کاهش میزان ترکیبات فنولیک آزاد در ارقام برنج قهوه‌ای ایرانی مورد مطالعه در اثر جوانه زدن مربوط به تجزیه‌ی این ترکیبات توسط آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی سنتز شده در اثر فرایند جوانه زدن باشد. آدوم و لیو (۲۰۰۲) تفاوت نسبت ترکیبات فنولیک باند شده به آزاد را مربوط به روش‌های استخراج این ترکیبات دانستند. آنها از روش مشابه استخراج

در این تحقیق اندازه‌گیری غلظت ترکیبات فنولیک آزاد و باند شده دال بر وجود همبستگی بین نوع رقم و میزان ترکیبات فنولیک می‌باشد طوری که تمامی ارقام به جز ندا دچار افت میزان ترکیبات فنولیک آزاد در اثر جوانه‌زدن شدند. رقم ندا نیز افت میزان ترکیبات فنولیک باند شده پس از جوانه‌زدن را نشان داد. این نتایج در حالیکه که بسیاری از محققین در گزارشات خود به افزایش میزان ترکیبات فنولیک اشاره داشته‌اند. کاکوویتا، ویلمسون و پوتانن در سال ۲۰۱۴ گزارش نمودند که در طی فرایند جوانه‌زنی سنتز آنزیم و اصلاح دانه منجر به افزایش غلظت ترکیبات فنولیک داخلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد [۲۴]. مونگ‌نارم و ساتونگ در سال ۲۰۱۰ افزایش میزان ترکیبات فنولیک برنج قهوه‌ای را از $3 \text{ mg GAE} / 100 \text{ g}$ به $7.03 \text{ mg GAE} / 100 \text{ g}$ بعد از ۲۴ ساعت جوانه زنی را گزارش نمودند [۲۵]. اعداد متفاوت به دست آمده در مورد میزان ترکیبات فنولیک در تحقیقات مختلف به نوع ارقام مورد استفاده، شرایط رویاندن، زمان رویاندن، زمان خیساندن و روش استخراج این ترکیبات بستگی دارد. در تحقیق حاضر میزان ترکیبات فنولیک باند شده در تمامی ارقام مورد بررسی بیشتر از ترکیبات فنولیک آزاد می‌باشد و این یافته بر خلاف یافته‌های تی و همکاران در سال ۲۰۱۴ منطبق است [۲۶]. مطابق نظر نازک و شهیدی در سال ۱۹۸۹ ترکیبات فنولیک باند شده با پیوند استری به ترکیبات دیواره سلولی مانند سلولز، پکتین و پلی ساکاریدها اتصال یافته‌اند. این ترکیبات با روش‌های معمول قابل استخراج به صورت کامل نمی‌باشند و همین مسأله در تخمین میزان آن‌ها ایجاد خطا می‌نماید [۲۷]. تغییرات میزان ترکیبات فنولیک آزاد و باند شده در اثر فرایند

نمونه‌ی جوانه زده به طور معنی‌داری بیش از این مقدار در نمونه‌ی شاهد (جوانه نروده) بود. با توجه به اینکه میزان ترکیبات فنولیک باند شده به طور کلی پس از جوانه‌زنی در اکثر ارقام افزایش یافت ولی نتایج نشان‌دهنده‌ی عدم تغییر معنی‌دار در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات می‌باشد بنابراین برخلاف سایر تحقیقات که بیانگر افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اثر جوانه‌زنی هستند [۲۹،۳۰]، نتایج ما چنان روندی را نشان نداد. در بسیاری از مقالات گزارش شده که فعالیت آنتی‌اکسیدانی برنج قهوه‌ای در طی جوانه‌زنی وابسته به دما و زمان است، این پدیده را می‌توان به تجمع بیشتر ترکیبات دارای فعالیت مهارکنندگی پروکسیل (مثل ترکیبات فنولیک) نسبت داد [۳۰].

همچنین گزارش شده که رویاندن دانه‌ها در دمای بالا (C ۴۲) سبب تحریک آنزیم‌های مهارکننده‌ی ترکیبات رادیکالی مختلفی مثل سوپر اکسید دسموتاز، گلوکاتایون-گ-ترانسفراز، کاتالاز، پراکسیدازها و آنزیم‌های موجود در چرخه‌ی آسکوربات-گلوکاتایون میشود [۳۱]. با توجه به استدلال‌های ذکر شده به نظر می‌رسد شاید استفاده از دماها و زمان‌های بالاتر رویاندن ارقام برنج قهوه‌ای ایرانی راهکار مؤثرتری برای افزایش میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی این ارقام باشد.

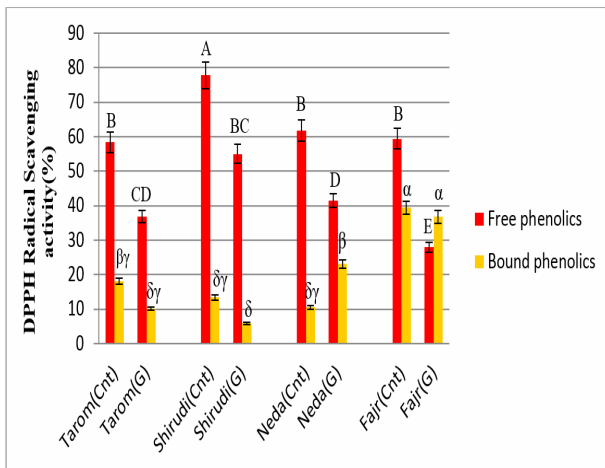


Fig 2 Comparison of free & bound phenolics related antioxidant activity in different Iranian brown rice cultivars before (cnt) & after germination (G). (Different alphabetic and latin letters indicate a significant difference ($\alpha < 0.05$) between antioxidant capacity of free and bound phenolic compounds in germinated & ungerminated forms of each cultivar)

این تحقیق برای ترکیبات فنولیک باند شده استفاده نمودند و میزان ترکیبات فنولیک باند شده به کل را بیشتر از نسبت ترکیبات فنولیک آزاد به کل در دانه‌های ذرت، گندم و جودوسر و برنج گزارش نمودند [۲۳]. نکته‌ی حائز اهمیت در این میان این است که ترکیبات فنولیک باند شده قابلیت جذب مستقیم توسط آنزیم‌های بدن انسان را ندارند بنابراین احتمالاً در اثر فعالیت‌های آنزیماتیک لوله‌ی گوارش انسان به آرامی آزاد و جذب می‌شود. ویتاگلیون، ناپلی‌تانو و فولگیانو در سال ۲۰۰۸ اظهار نمودند که فنولیک‌های باند شده در اثر فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکوزیداز و استرازهای قسمت پایینی لوله‌ی گوارش (کولون) به آرامی آزاد و جذب می‌شوند [۲۸]. همچنین در برخی از منابع اشاره شده که فنولیک‌های دیواره‌ی سلولی دارای خواص آنتی‌موتازنیک هستند و این فعالیت فیزیولوژیکی آن‌ها در ممانعت از بروز سرطان در رژیم‌های حاوی این ترکیبات حائز اهمیت است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بالاتر بودن میزان ترکیبات فنولیک باند شده در ارقام مورد بررسی تحت تأثیر جوانه‌زدن (به جز رقم ندا) یک مزیت بسیار بزرگ در استفاده از این ارقام در تولید غذاهای فراسودمند ضد سرطان است.

۳-۳- میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان

در شکل ۲ به مقایسه‌ی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به ترکیبات فنولیک آزاد و باند شده در ارقام مورد بررسی تحت تأثیر فرایند جوانه‌زنی پرداخته شده است. به طور خلاصه بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به ترکیبات فنولیک آزاد رقم شیرودی پیش از جوانه‌زنی بود در حالیکه بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک باند شده به ترتیب در رقم فجر جوانه‌زده و جوانه‌زده مشاهده شد. همچنین شکل ۲ بیانگر بالاتر بودن میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به ترکیبات فنولیک آزاد نسبت به باند شده در تمامی ارقام مورد بررسی (به جز رقم فجر جوانه‌زده) می‌باشد. در مورد تأثیر فرایند جوانه‌زنی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک آزاد و باند شده در تمامی ارقام مورد بررسی جوانه‌زدن سبب کاهش قدرت مهار رادیکال DPPH شد (به جز فعالیت آنتی‌اکسیدانی فنولیک‌های باند شده رقم ندا). در حالیکه در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک باند شده ارقام مورد بررسی این شاخص در تمامی ارقام به جز ندا تغییر معنی‌داری در اثر جوانه‌زدن نکرد. در رقم ندا فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به

۴- نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده از انجام آزمونهای مذکور به جز رقم بومی طارم بقیه‌ی ارقام مورد مطالعه پس از جوانه‌زدن دچار افزایش معنی‌دار میزان گابا شدند. بالاترین میزان گابا در رقم شیروودی جوانه‌زده ($193/78 \text{ ppm}$) به دست آمد. فرایند جوانه‌زدن سبب کاهش میزان ترکیبات فنولیک آزاد ارقام مورد مطالعه شد. بیشترین ترکیبات فنولیک آزاد در رقم ندای شاهد ($119/87$) مشاهده شد. میزان ترکیبات فنولیک باند شده پس از جوانه‌زدن در نمونه‌ی شیروودی افزایش معنی‌دار ولی در نمونه‌های ندا و فجر کاهش معنی‌داری یافت. میزان این ترکیبات قبل و بعد از جوانه زنی در رقم طارم بومی تغییر معنی‌داری نداشت. بیشترین میزان ترکیبات فنولیک باند شده در رقم فجرشاهد ($305/46$) مشاهده شد. به طور کلی جوانه‌زنی سبب افزایش درصد نسبت ترکیبات فنولیک باند شده به فنولیک کل در مقایسه با نسبت ترکیبات فنولیک آزاد به فنولیک کل شد البته به جز رقم ندا که روند معکوسی را نشان داد. فرایند جوانه‌زنی سبب افت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به ترکیبات فنولیک آزاد شد. بیشترین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات ($77/8$) مربوط به رقم شیروودی شاهد بود. فرایند جوانه زنی به جز در مورد رقم ندا تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی سایر ارقام مورد مطالعه نداشت. ترکیبات فنولیک باند شده‌ی رقم ندا پس از جوانه زنی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به شاهد خود نشان دادند. بیشترین قدرت مهار رادیکال $DPPH$ ترکیبات فنولیک باند شده در رقم شاهد فجر ($39/4$) مشاهده شد. همچنین بر اساس نتایج حاصله برای غنی‌سازی مواد غذایی با گابا بهتر است از رقم شیروودی جوانه زده استفاده شود. به منظور فرموله نمودن محصول غذایی مؤثر در پیشگیری از سرطان به ویژه سرطان کولون استفاده از رقم فجر جوانه زده به دلیل وجود ترکیبات فنولیک باند شده‌ی بالا توصیه می‌شود. همچنین برای غنی‌سازی مواد غذایی با ترکیبات دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی زیاد استفاده از رقم شیروودی جوانه زده توصیه می‌شود.

۵- منابع

- [1] Zamani, Gh., Alizadeh, M. (2009). Iran rice characterization, Tehran, Pelk publishing, 2-48.
- [2] Patil, SB., Khan, MK. (2011). Germinated brown rice as a value added rice product: A review. *J Food Sci Technol*, 48(6):661-667.
- [3] Caceres, P.J., Martinez-Villaluenga, C., Amigo, L., Frias, J. (2014). Maximizing the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food Chemistry*, 152, 407-414.
- [4] Monks, J.L., Vanier, N.L., Casaril, J., Berto, R.M., de Oliveira, M., Gomes, C.B. et al. (2013). Effects of milling on proximate composition, folic acid, fatty acids and technological properties of rice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(2): 73-79.
- [5] Zhang, G., Malik, V.S., Pan, A., Kumar, S., Holmes, M.D., Spiegelman, D. et al. (2010). Substituting brown rice for white rice to lower diabetes risk: a focus-group study in Chinese adults. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(8): 1216-1221.
- [6] Ito, S. Marketing of value-added rice products in Japan: Germinated brown rice and rice bread. Food Agricultural Organization. FAO rice conference, Rome, Italy.
- Available at: URL: <http://www.fao.org/rice2004/en/pdf/ito.pdf>. Accessed 22.08.2013.
- [7] Oh, S.H., Oh, C.H. (2003). Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulating immune cells. *Food Science and Biotechnology*, 12, 248-252.
- [8] Oh, C.H., Oh, S.H. (2004). Effects of germinated brown rice extract with enhanced levels of GABA of cancer cell proliferation and apoptosis. *Journal of Medical Food*, 7, 19-23.
- [9] Imam, M.U., Azmi, N.H., Bhangar, M.I., Ismail, N., Ismail, M. (2012). Antidiabetic properties of germinated brown rice: a systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-12.
- [10] Kayahara, H., Tsukahara, K. Flavor, health and nutritional quality of pre-germinated brown rice, Presented at 2000 Int Chem Congr Pac Basin Soc in Hawaii, 2000.
- [11] Brand-Miller, J., Hanyne, S., Petocz, P., Colagiuri, S. (2003). Low-glycemic index diets in the management of diabetes: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes care*, 26(8): 2261-2267.

- [22] Choi, ID., Kim, DS., Son, JR., Yang, CI., Chun, JY., Kim, KJ.(2006). Physico-chemical properties of giant embryo brown rice (Keunnunbyeon). *J Appl Biol Chem*, 49(3):95-100.
- [23] Adom, KK., Liu, RH.(2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21): 6182-6187.
- [24] Kaukovirta-Norja, A., Wilhelmsson, A., Poutanen, K.(2004). Germination: A means to improve the functionality of oat. *Agricultural Food Science*, 13, 100-112.
- [25] Moongngarm, A., Saetung, N.(2010). Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chemistry*, 122, 782-788.
- [26] Ti, H., Zhang, R., Zhang, M., Li, Q., Wei, Z., Zhang, Y & et al. (2014). Dynamic changes in the free and bound phenolic compounds and antioxidant activity of brown rice at different germination stages. *Food Chemistry*, 161, 337-344.
- [27] Naczk, M., Shahidi, F.(1989). The effect of methanol-ammonia-water treatment on the content of phenolic acids of canola. *Food Chemistry*, 31, 159-164.
- [28] Vitaglione, P., Napolitano, A., Fogliano, V.(2008). Cerealdietary fiber: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science & Technology*, 19(9): 451-463.
- [29] Tian, S., Nakamura, K., Kayahara, H.(2004). Analysis of Phenolic Compounds in White Rice, Brown Rice, and Germinated Brown Rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15): 4808-4813.
- [30] Andriantsitohaina, R., Auger, C., Chataigneau, T., Étienne-Selloum, N Li., Martínez, MC., Laher, I & et al.(2012). Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *British Journal of Nutrition*, 108(9):1532-1549.
- [31] Gupta, NK., Agarwal, S., Agarwal, VP., Nathawat, NS., Gupta, S., Singh, G.(2013). Effect of short-term heat stress on growth, physiology and antioxidative defense system in wheat seedlings, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(6):1837-1842.
- [12] Hiroshi, C.(2005). Attraction of germinated brown rice and contribution to rice consumption expansion. *Proc Workshop and Conf on Rice in the World at Stake*, 67-70.
- [13] Jiamyangyuen, S., Ooraikul, B.(2008). The physico-chemical, eating and sensorial properties of germinated brown rice. *Journal of food agriculture and environment*, 6(2): 119.
- [14] Chinma, CE., Anuonye, JC., Simon, OC., Ohiare, RO., Danbaba, N. (2015). Effect of germination on the physicochemical and antioxidant characteristics of rice flour from three rice varieties from Nigeria. *Food Chemistry*, 185: 454-458.
- [15] Chen, HH., Chang, HC., Chen, YK., Hung, CL., Lin, SY., Chen, YS.(2016). An improved process for high nutrition of germinated brown rice production: Low-pressure plasma. *Food Chemistry*, 191, 120-127.
- [16] Moongngarm, A., Saetung, N.(2010). Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chem*, 122(3):782-788.
- [17] Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J., Beta, T.(2014). Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 59(2): 211-218.
- [18] Donkor, ON., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., Vasiljevic, T.(2012). Germinated grains Sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*. 135(3): 950-959.
- [19] Vadivel, V., Brindha, P. (2015). Antioxidant property of solvent extract and acid/alkali hydrolysates from rice hulls. *Food Bioscience*, 11, 85-91.
- [20] Shelp, BJ., Bozzo, GG., Trobacher, CP., Zarei, A., Deyman, KL., Brikis, CJ.(2012). Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Science*, 193-194, 130-135.
- [21] Saikusa, T., Horino, T., Mori, Y. (1994). Accumulation of c-aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 2291-229.

Investigation the effect of germination on phenolic compounds, antioxidant activity and gamma amino butyric acid concentration in different Iranian brown rice cultivars

Shokri Ghaleh, S. ¹, Saremnezhad, S. ^{2*}

1. MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

(Received: 2017/08/14 Accepted:2018/10/22)

The aim of this study was to investigate the effect of germination on nutritional and functional properties of different Iranian brown rice cultivars. In this regard, three modified cultivars (Fajr, Shirudi, Neda) and one local cultivar (Tarom) was selected and after 24h soaking, germinated for 24h. The cultivars analyzed for their γ -Amino butyric acid (GABA), free and bound phenolics and their related DPPH radical scavenging activities. According to the obtained results, germination process caused significant increase of GABA ($p < 0.05$) (except local cultivar Tarom). Free phenolic compounds decreased significantly as affected by germination. This reduction was also observed for bound phenolics in germinated Neda and Fajr cultivars but Shirudi showed significant increasing of these compounds after germination. Investigating the effect of germination on antioxidant capacity of cultivars revealed the significant decrease of free phenolics antioxidant activity but didn't affect bound phenolics related antioxidant capacity (except Neda cultivar). According to the obtained results, each of the studied cultivars due to its specific characteristic can be used for fortification and production of functional foods.

Key words: Brown rice, Germination, GABA, Functional, Phenolic compounds.

* Corresponding Author E-Mail Address: Saremnezhad@gmail.com