

SỰ BIẾN ĐỔI CỦA ACID GLUTAMIC VÀ HOẠT TÍNH GLUTAMATE DECACBOXYLASE TRONG QUÁ TRÌNH NGÂM VÀ NẤY MẦM CỦA GẠO LỨT NGUYÊN PHÔI

Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Triệu Ngọc Hân, Lê Nguyễn Đoàn Duy và Nguyễn Công Hà

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

ABSTRACT

To understand more about the soaking and germination of pre-germinated brown rice, firstly, study on changes of enzyme GAD activity and glutamic acid content of two rice varieties as MBD and IR50404 under different soaking conditions like different pH values (3÷ 6), optimal pH value added with various rice bran extract (3÷7%), optimal pH value added with various acid glutamic (0.2÷0.6%) were done. Secondly, the brown rice after soaked in three optimal soaking conditions from the previous experiments were incubated at 37°C for 20 to 28 hours to determine the changes of various GAD activity as well as glutamic acid content during the germination. The results showed that optimal pH value for soaking in 6 hours of MBD was pH 4 while pH 5 for IR50404. Maximal GAD activity of MBD was 12.069 UI/g, glutamic acid content was 1337.950 mg% while for IR50404, maximal GAD activity was 15.475 UI/g, glutamic acid was 1410.150 mg%. When supplemented with 0.6% glutamic acid, GAD activity increased considerably in both rice varieties, 20.148 UI/g for IR50404 and 18.811 UI/g for MBD. Rice bran extract did not affect to these parameters. During the germination, after 28 hours incubation, when supplemented with 0.6% glutamic acid in soaking stage, the GAD activity increased higher than value of control sample as well as values of rice bran extract samples in germination stage. Maximal GAD activity was 37.108 UI/g for IR50404 while 34.527 UI/g for MBD. The results indicated that just glutamic acid affected to GAD during germinated brown rice production.

TÓM TẮT

Để hiểu rõ hơn về quá trình ngâm và nảy mầm của gạo lứt nguyên phôi, nghiên cứu về sự thay đổi hoạt tính enzyme GAD và hàm lượng acid glutamic của 2 giống lúa a MBD và IR50404 ở các điều kiện dung dịch ngâm có pH 3÷ 6; pH tối thích bổ sung dịch cám 3÷7% và pH tối thích bổ sung acid glutamic 0,2÷0,6% đã được thực hiện. Gạo lứt sau khi ngâm ở pH tối ưu, pH tối ưu có bổ sung dịch cám tốt nhất và pH tối ưu có bổ sung acid glutamic thích hợp nhất được đem ủ ở 37 °C, yếm khí để quan sát sự biến đổi của GAD cũng như acid glutamic từ 20÷28 giờ. Kết quả cho thấy, sau 6 giờ ngâm, IR50404 có hoạt tính GAD cao nhất tại pH 5 đạt 15,475 UI/g, acid glutamic là 1410,150 mg%, MBD có hoạt tính GAD cao nhất tại pH 4 đạt 12,069 UI/g, acid glutamic là 1337,950 mg%. Khi bổ sung 0,6% acid glutamic, hoạt tính GAD tăng đáng kể ở cả hai giống lúa IR50404 là 20,148 UI/g và MBD là 18,811 UI/g. Trong khi đó, việc bổ sung dịch cám không có ảnh hưởng nhiều đến hoạt tính GAD cũng như acid glutamic trong gạo ở cả hai giống trong suốt quá trình ngâm. Trong giai đoạn nảy mầm, sau 28 giờ ủ, khi có bổ sung 0,6% acid glutamic thì hoạt tính GAD cao hơn nhiều so với mẫu đối chứng và mẫu có bổ sung dịch cám; đối với IR50404 là 37,108 UI/g, với MBD là 34,527 UI/g. Như vậy, chỉ có acid glutamic là có tác động đến việc tăng hoạt tính GAD trong quá trình ngâm và nảy mầm.

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 24/10/2016

Title:

Changes of glutamic acid content and glutamate decarboxylase during the soaking and germination of pre-germinated brown rice

Từ khóa:

Gạo lứt, gạo mầm, glutamic acid, GAD
Changes of glutamic acid content and glutamate decarboxylase activity during the soaking and germination of brown rice

Keywords:

Germination, glutamate decarboxylase, glutamic acid, pre-germinated brown rice, soaking

Trích dẫn: Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Triệu Ngọc Hân, Lê Nguyễn Đoàn Duy và Nguyễn Công Hà, 2016. Sự biến đổi của acid glutamic và hoạt tính glutamate decarboxylase trong quá trình ngâm và nảy mầm của gạo lứt nguyên phôi. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 1): 66-74.

1 GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, việc phát triển các loại sản phẩm từ lúa gạo có giá trị dinh dưỡng cao đang là vấn đề được quan tâm ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) nhằm tăng cường và nâng cao giá trị của cây lúa gạo của vùng nói riêng, giá trị gạo Việt Nam nói chung. Gạo lứt chứa rất nhiều thành phần dinh dưỡng cho con người như: chất xơ, protein, chất béo, khoáng và các vitamin (Ohtsubo *et al.*, 2000) đặc biệt là các hợp chất chức năng như γ -aminobutyric acid (GABA), tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol, ferulic acid (Tian *et al.*, 2004). Gạo lứt nảy mầm đã được chú ý và nghiên cứu trong những năm gần đây. Quá trình nảy mầm giúp cải thiện chất lượng gạo, làm gạo mềm hơn sau khi nấu (Chungcharoen *et al.*, 2015). Hàm lượng các chất dinh dưỡng cũng như các hợp chất chức năng, các chất chống oxy hóa trong gạo lứt nảy mầm cao hơn nhiều so với gạo chưa nảy mầm (You *et al.*, 2015). Đặc biệt hàm lượng GABA trong gạo mầm cao gấp 9,43-16,74 lần so với gạo lứt (Banchuen *et al.*, 2010). GABA là một acid amin phi protein bốn carbon, sản xuất chủ yếu bởi các phản ứng khử carboxyl của acid glutamic, được xúc tác bởi các enzyme decarboxylase glutamate (GAD) (Khwanchai *et al.*, 2014). Nó hoạt động như một chất dẫn truyền thần kinh, một chất hóa học thúc đẩy sự giao tiếp giữa các dây thần kinh, giúp duy trì hoạt động bình thường của não bộ, giảm bớt hoạt động căng thẳng của các neuron thần kinh (Dinesh *et al.*, 2009). GABA làm giảm bệnh cao huyết áp, ngăn chặn sự phát triển của tế bào ung thư, giảm chứng nhức đầu, mất ngủ (Okada *et al.*, 2000; Patil và Khan, 2011).

ĐBSCL có rất nhiều giống lúa được trồng và xuất khẩu. Tuy nhiên, nghiên cứu gần đây cho thấy chỉ một số giống lúa được trồng ở đây như IR50404 hay MBĐ có triển vọng trong việc sản xuất gạo mầm (Trung và *ctv.*, 2016). Giống lúa IR50404 là giống lúa rất phổ biến ở ĐBSCL, có khả năng chịu phèn chua tốt, năng suất cao tuy nhiên chất lượng không tốt, giá bán không cao. Nghiên cứu về quá trình nảy mầm sinh GABA của giống lúa này cho thấy nó có khả năng sinh tổng hợp GABA cao nhất trong điều kiện yếm khí 1-5% CO₂ được thực hiện (Lê Nguyễn Đoàn Duy và Nguyễn Công Hà, 2014). Tuy nhiên, cơ chế việc sinh tổng hợp GABA thông qua hoạt động của enzyme GAD cũng như các yếu tố khác như glutamic acid, CaCl₂ đến hoạt tính của GAD vẫn chưa được nghiên cứu. Giống lúa MBĐ có nhiều đặc tính tốt như hạt chắc đều, ít bị gãy khi xay xát, tỉ lệ bạc bụng thấp, khi nấu cơm có mùi thơm, mềm xốp giàu dinh dưỡng nhưng năng xuất lúa thấp. Đến thời điểm này, những nghiên cứu xung

quanh khả năng nảy mầm và hoạt tính GAD là chưa được nghiên cứu. Với mong muốn hiểu rõ hơn mối liên hệ giữa một số yếu tố có khả năng ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme GAD trong quá trình ngâm và nảy mầm như pH, acid glutamic, dịch cám, nghiên cứu này đã được thực hiện.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên vật liệu

Hai giống lúa IR50404 và MBĐ được mua ở Viện Nghiên cứu và Phát triển ĐBSCL, Trường Đại học Cần Thơ. Chúng được xát trấu nhưng vẫn giữ được phôi bằng thiết bị tách trấu Yanmar ST50 trước khi được sử dụng trong quá trình ngâm và nảy mầm. Một số thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu như máy đo mật độ quang phổ Spectrophotometer (CECIL, UK), máy ly tâm lạnh 2323k Hermel – máy lắc SK600 – Q059083. Hóa chất chuẩn như glutamic acid, GABA được mua từ Sigma Aldrich, các hóa chất khác có xuất xứ từ Trung Quốc.

2.2 Quá trình ngâm và nảy mầm

Cân 100 g gạo lứt sau khi tách vỏ rửa, loại bỏ tạp chất. Tiến hành ngâm trong 300 mL dung dịch có pH là 3, 4, 5, 6 đến khi mẫu đạt độ ẩm bão hòa (6 giờ); với mục đích xác định pH ngâm thích hợp nhất để sử dụng cho quá trình ngâm gạo lứt. Sau khi xác định được pH ngâm, dung dịch ngâm sẽ được bổ sung vào acid glutamic ở các nồng độ khác nhau: 0; 0,2; 0,4; 0,6% (so với dịch ngâm) và nồng độ dịch cám khác nhau: 0; 3; 5; 7% (so với dịch ngâm) ở nhiệt độ phòng (30°C±2) để khảo sát. Để thực hiện quá trình ủ, cân 100g gạo lứt đã tách vỏ rửa qua một lần với nước sạch để loại bỏ tạp chất, ngâm vào trong dung dịch đệm pH tốt nhất cũng như dịch ngâm có bổ sung nồng độ glutamic tối thích và nồng độ dịch cám tốt nhất để mẫu đạt độ ẩm bão hòa (khoảng 6 giờ), vớt ra đem ủ để hạt nảy mầm trong tủ kín với thời gian ủ là 20; 24; 28 giờ ở 37°C trong tủ ủ CO₂ SANYO MCO – 5AC. Mẫu ở các mốc thời gian sẽ được đem đi phân tích hàm lượng acid glutamic và hoạt tính enzyme GAD để xác định thời gian ủ thích hợp.

2.3 Xác định pH và nhiệt độ tối ưu của enzyme GAD

Gạo lứt (IR50404, MBĐ) sau khi xay nhuyễn được cân chính xác 0,2 g hòa tan trong 20 mL đệm phosphate ở các pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7 và tiến hành ly tâm 10.000 vòng ở 4°C trong 15 phút. Sau đó, tiến hành thủy phân ở các mức nhiệt độ 30; 35; 40; 45°C. Mẫu sẽ được đem đi phân tích để xác định hoạt tính enzyme GAD.

2.4 Xác định hàm lượng acid glutamic bằng phương pháp của Spies (1957)

Đầu tiên cân 2 g mẫu gạo lứt, nghiền mịn và cho vào bình tam giác (50 mL). Bổ sung thêm 9 mL nước cất vào và lắc khoảng 90 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó lấy mẫu ra lọc và lấy 2 mL dịch lọc cùng với 2 mL dung dịch ninhydrin 0,2% , hỗn hợp được đun nóng 5 phút ở nhiệt độ sôi. Sau khi đun nóng tiến hành làm nguội nhanh trong nước lạnh và đo quang phổ ở bước sóng 570 nm.

2.5 Xác định hoạt tính enzyme GAD bằng phương pháp của Zhang et al. (2004)

Cân 0,2 g gạo lứt nảy mầm đã được xay mịn cho vào ống ly tâm, bổ sung thêm 20 mL đệm phosphate 0,04M (pH=5,5) và đặt ống ly tâm vào một cốc nước đá lạnh. Tiến hành ly tâm mẫu 10.000 vòng ở 4°C trong 15 phút. Lấy phần dịch enzyme (xác định thể tích enzyme sau khi trích) và bảo quản ở 4°C. Để xác định hoạt tính enzyme GAD, lấy 0,2 mL dịch enzyme sau khi trích ly cho vào ống nghiệm, thêm vào 0,2 mL đệm phosphate 0,04M, 0,2 mL L-glutamic chuẩn 10mM, 0,2 mL 5'pyridoxal phosphate 0,1mM. Đem ống nghiệm đi ủ ở 40 °C trong 30 phút. Sau khi ủ xong tiến hành làm lạnh nhanh bằng nước đá và thêm vào 0,4 mL đệm borate 0,2M (pH=7), 2 mL phenol 6% và 0,4 mL sodium hypochlorite. Đun nóng hỗn hợp này ở 100 °C trong 10 phút và làm nguội nhanh bằng nước đá trong 20 phút. Đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 630 nm.

2.6 Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. Kết quả được xử lý bằng phần mềm ứng dụng MS. Excel 2010. Tính toán thống kê, phân tích phương

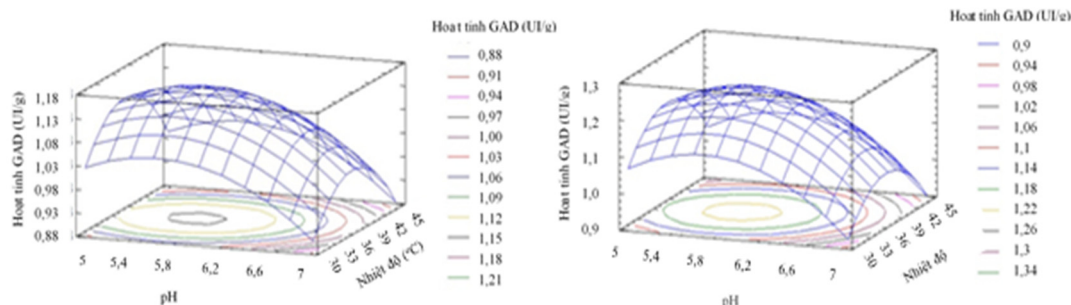
sai, kiểm định LSD, Vex bằng phần mềm Statgraphics Centurion 16.1.18. Xác định các thông số động học V_{max} , K_m bằng phần mềm SAS 9.1.3.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Nhiệt độ và pH tối ưu của GAD đối với 2 giống lúa IR50404 và Một Bụi Đỏ

Theo Lê Ngọc Tú (2004), pH và nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính cũng như tốc độ phản ứng của enzyme. Đồng thời, cấu trúc không gian của enzyme cũng thay đổi theo pH, mỗi enzyme hoạt động mạnh nhất ở một khoảng pH nhất định, và giảm khi pH quá cao hoặc quá thấp (Nguyễn Thị Hiền và *ctv.*, 2009). Chính vì vậy, mục đích của thí nghiệm này là xác định được pH và nhiệt độ tối ưu của enzyme GAD trong gạo lứt nguyên liệu của hai giống lúa IR50404 và MBĐ.

Kết quả ở Hình 1 cho thấy khi thay đổi pH từ 5 đến 7 dẫn đến hoạt tính của GAD cũng thay đổi. Hoạt tính GAD trên giống lúa IR50404 thay đổi ở các mức pH khác nhau. Hoạt tính của enzyme tăng dần từ pH 5 đến 5,5 và giảm nhanh từ pH 6 đến 7, hoạt tính enzyme đạt cực đại ở pH 5,5 và có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5% so với các giá trị pH khác; giống IR50404 ở pH 5,5 có hoạt tính GAD là 1,179 UI/g. Do đó, pH 5,5 là pH tối ưu cho hoạt động của GAD trong gạo IR50404. pH này phù hợp với điều kiện pH tối ưu của GAD trong gạo mầm, pH tối ưu từ 5,5 đến 5,8 (Zhang et al., 2006). Kết quả cũng cho thấy, hoạt tính GAD tăng khi tăng nhiệt độ từ 30 oC đến 40 oC và giảm xuống nếu tiếp tục tăng nhiệt độ lên 45 oC trên giống lúa IR50404. Vì vậy, 40 oC là nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của GAD trong gạo.



Hình 1: pH và nhiệt độ tối ưu của enzyme GAD hai giống lúa IR50404 (T) và MBĐ (P)

Kết quả ở Hình 1 (T) cho thấy đối với giống lúa MBĐ, tại các giá trị pH thì hoạt tính enzyme trong giống lúa MBĐ có thay đổi đáng kể. Khi pH tăng dần, đến pH 5,5 hoạt tính enzyme ở mức cao. Bên cạnh đó, nhiệt độ tăng dần từ 30°C lên 40°C thì

hoạt tính enzyme đạt cực đại ở nhiệt độ 40°C là 1,279 UI/g. Vì vậy, 40°C là nhiệt độ tối ưu nên chọn cho hoạt động của enzyme GAD trong giống lúa MBĐ. Qua đó, nghiên cứu xác định được pH và nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của enzyme GAD là pH 5,5 và nhiệt độ 40°C.

3.2 Ảnh hưởng của pH, acid glutamic và dịch cám trong giai đoạn ngâm ở nhiệt độ

phòng đến hoạt tính enzyme GAD

Bảng 1: Thành phần nguyên liệu của gạo IR50404 và Một Bụi Đỏ

Nguyên liệu gạo	Protein tổng (%)	Lipid (%)	Độ ẩm (%)	Acid glutamic (mg%)	Hoạt tính GAD (UI/g)
IR50404	10,211±0,012	2,730±0,002	10,297±0,009	1024,770±9,200	1,179±0,001
Một Bụi Đỏ	8,461±0,010	2,580±0,002	11,610±0,011	998,841±8,150	1,279±0,001

Trong quá trình ngâm hạt, thời gian ngâm hạt có ảnh hưởng đến chất lượng, thành phần hóa cũng như các hợp chất chức năng có trong hạt. Khi ngâm gạo lứt độ ẩm tăng rất nhanh do chênh lệch giữa độ ẩm bên trong và bên ngoài hạt do sự hấp thu nước của phôi hạt (Bello *et al.*, 2004), từ 2 đến 6 giờ độ ẩm của gạo bắt đầu tăng chậm dần và đạt điểm bão hòa sau khoảng 6 giờ (Lê Nguyễn Đoàn Duy và Nguyễn Công Hà, 2014). Sau 6 giờ độ ẩm không thay đổi đáng kể là do lúc này các phân tử tinh bột hút nước trương nở làm khoảng cách giữa các phân tử nhỏ lại nên hút nước chậm lại. Ngoài ra, trong quá trình ngâm, một số hợp chất trong gạo sẽ hòa tan vào trong nước như các polysaccharide, protein và các hợp chất khác. Do đó, thời gian ngâm 6 giờ là thời gian hạt hút nước bão hòa tốt nhất, vì nếu ngâm hạt càng lâu trong nước sẽ làm mất nhiều các chất dinh dưỡng tan trong nước và tạo điều kiện cho sự phát triển của vi sinh vật.

3.2.1 Ảnh hưởng của pH đến quá trình ngâm sinh tổng hợp GAD ở nhiệt độ phòng

Khi ngâm gạo lứt trong nước, độ ẩm trong hạt tăng lên sẽ là điều kiện để hàng loạt các phản ứng phức tạp xảy ra, một trong số đó là sự kích hoạt các enzyme nội bào có trong hạt hoạt động. Theo Lê Nguyễn Đoàn Duy và Nguyễn Công Hà (2014), việc ngâm gạo lứt có ảnh hưởng tới việc hình thành các hợp chất chức năng cũng như GABA trong gạo. Enzyme GAD được kích hoạt trong quá trình

ngâm, chuyển đổi acid glutamic thành một dạng hợp chất chức năng có lợi cho cơ thể là GABA. Ngoài ra, theo Komatsusaki *et al.* (2007), ở điều kiện gạo lứt hơi acid sẽ kích hoạt enzyme GAD hoạt động mạnh hơn. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, hoạt tính GAD thay đổi khi ngâm trong các dung dịch pH khác nhau. Đối với IR50404 thì hoạt tính GAD tăng cao nhất khi ngâm hạt trong dung dịch citrate pH 5 và đạt giá trị cao nhất 15,475 UI/g tăng 13,26 lần so với gạo lứt chưa ngâm (IR50404 là 1,179UI/g). Còn đối với giống MBĐ, hoạt tính enzyme đạt cao nhất là 12,069 UI/g khi ngâm trong dung dịch citrate pH 4, hoạt tính enzyme tăng 9,43 lần so với gạo lứt ban đầu (MBĐ là 1,279UI/g). Theo Tsushida and Murai (1987), hoạt động của enzyme GAD bị ảnh hưởng bởi điều kiện căng thẳng do trạng thái thiếu oxy gây ra. Hoạt tính enzyme tăng so với gạo lứt nguyên liệu do trong quá trình ngâm làm thiếu hụt oxy, giảm pH nội bào kích thích hoạt động của enzyme glutamate decarboxylase (GAD). Do đó, pH có tác dụng làm tăng hoạt tính enzyme GAD. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Paidaeng *et al.* (2013), cho thấy hoạt tính của enzyme GAD tăng lên nhanh chóng sau quá trình ngâm. Bên cạnh đó, ngoài pH thì giống gạo cũng ảnh hưởng tới hàm lượng acid glutamic do mỗi giống có đặc tính, thành phần khác nhau nên hoạt tính enzyme thay đổi cũng khác nhau.

Bảng 2: Hàm lượng acid glutamic và hoạt tính enzyme GAD của giống gạo IR50404 và Một Bụi Đỏ khi ngâm trong các dung dịch pH khác nhau

pH	Giống IR50404		Giống Một Bụi Đỏ	
	Hàm lượng acid glutamic (mg%)	Hoạt tính enzyme GAD (UI/g)	Hàm lượng acid glutamic (mg%)	Hoạt tính enzyme GAD (UI/g)
3	1357,170 ^{ab}	13,909 ^b	965,100 ^c	10,222 ^b
4	1272,910 ^b	12,153 ^c	1337,940 ^a	12,069 ^a
5	1410,150 ^a	15,475 ^a	1208,260 ^b	9,579 ^b
6	1071,620 ^c	10,182 ^c	868,618 ^d	7,457 ^c

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát ở độ tin cậy 95%

Theo Zhang *et al.* (2006), enzyme glutamate decarboxylase là enzyme xúc tác chuyển acid glutamic thành GABA và CO₂ ở điều kiện hơi acid, khi hoạt tính enzyme GAD lớn thì hàm lượng GABA được tổng hợp nhiều và ngược lại. Dựa vào

kết quả phân tích hàm lượng GABA sinh ra sau quá trình ngâm của hai giống lúa thì hàm lượng GABA trong gạo của giống IR50404 đạt cao nhất ở dung dịch đệm pH 5; MBĐ là pH 4. Hàm lượng GABA của giống IR50404 đạt 93,499 mg% tại pH 5, tăng so với nguyên liệu IR50404 có hàm lượng

GABA là 42,078 mg%. Hàm lượng GABA trong MBĐ có giá trị cao nhất là 51,417 mg% tại pH 4 so với nguyên liệu MBĐ có hàm lượng GABA là 43,481 mg%. Kết quả này phù hợp với kết quả phân tích hoạt động của enzyme GAD khi ngâm gạo lứt trong dung dịch pH 5, ở giá trị pH 4 có lượng GABA sinh ra tỉ lệ thuận với hoạt động của enzyme GAD tương ứng với giống IR50404, MBĐ. Hàm lượng GABA cao hay thấp còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố như pH dịch ngâm, thời gian ngâm, điều kiện nảy mầm, nồng độ CO₂, nồng độ enzyme, cơ chất phản ứng.

Bên cạnh sự thay đổi hoạt tính của enzyme GAD thì hàm lượng acid glutamic trong gạo lứt sau quá trình ngâm ở các dung dịch pH ngâm khác nhau. Kết quả thống kê ở Bảng 2 cho thấy, hàm lượng acid glutamic trong gạo lứt thay đổi so với gạo lứt ban đầu trong quá trình ngâm gạo ở các pH khác nhau. Khi ngâm trong dung dịch đệm citrate pH 5, gạo lứt giống IR50404 sinh ra hàm lượng acid glutamic cao nhất là 1410,150 mg/100 g, đối với giống MBĐ đạt hàm lượng acid glutamic cao nhất là 1337,940 mg% tại pH 4. Theo kết quả nghiên cứu của Paidaend *et al.* (2013), quá trình ngâm hạt sẽ làm tăng hàm lượng acid glutamic, điều này là do trong quá trình ngâm, một số loại enzyme phân giải protein được kích hoạt tạo thành các acid amin tự do trong đó đặc biệt là acid glutamic. Hơn nữa acid glutamic được tổng hợp từ glutamate synthetase và glutamate synthase mà các enzyme này đóng một vai trò quan trọng trong sự tích tụ khí để tổng hợp acid glutamic. Theo Bảng 2, hàm lượng acid glutamic của hai giống gạo có sự thay đổi đáng kể so với nguyên liệu. Đối với giống IR50404 là 1410,150 mg% tăng 1,45 lần so với nguyên liệu ban đầu (hàm lượng acid glutamic ban đầu của Giống IR50404 là 1024,77 mg%). Đối với giống MBĐ là 1337,950 mg% tăng 1,37 lần so với nguyên liệu ban đầu (hàm lượng acid glutamic của MBĐ nguyên liệu là 998,841 mg%). Kết quả thí nghiệm phù hợp với nghiên cứu của Shahin *et al.* (2009), quan sát được hàm lượng acid glutamic tăng lên trong quá trình ngâm so với mẫu gạo lứt không ngâm. Kết quả cho thấy pH có tác dụng trong việc làm tăng hàm lượng acid glutamic trong

mẫu gạo lứt. Để các hợp chất chức năng trong gạo sinh ra cao nhất thì việc chọn điều kiện nảy mầm tối ưu cho nguyên liệu là cần thiết. Dựa trên kết quả phân tích, gạo lứt được ngâm trong dung dịch citrate pH 5 đối với giống IR50404; pH 4 đối với giống MBĐ trong 6 giờ để tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

3.2.2 Xác định nồng độ acid glutamic thích hợp bổ sung vào dịch ngâm

Việc ngâm gạo lứt có ảnh hưởng rất lớn đến việc hình thành hợp chất cũng như hệ enzyme trong gạo (Lê Nguyễn Đoàn Duy và Nguyễn Công Hà, 2014); đặc biệt là khi ngâm gạo trong môi trường acid sẽ kích thích enzyme GAD hoạt động mạnh hơn. Enzyme GAD xúc tác chuyển hóa acid glutamic trong gạo sinh ra hàm lượng GABA cao hơn khi ngâm trong môi trường acid so với trung tính. Acid glutamic là cơ chất của GAD nên khi được bổ sung vào dịch ngâm cũng sẽ góp phần thúc đẩy hoạt động của enzyme tạo GABA nhiều hơn (Qian *et al.*, 2014). Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, khi bổ sung acid glutamic với các nồng độ khác nhau vào dịch ngâm thì có thay đổi hoạt tính enzyme GAD trong gạo ngâm so với gạo ngâm không bổ sung. Hoạt tính enzyme của cả hai giống IR50404 và MBĐ đều đạt cao nhất khi bổ sung vào dịch ngâm 0,6%; đối với giống IR50404 là 20,148 UI/g cao hơn 1,3 lần so với gạo ngâm không bổ sung (15,475 UI/g), MBĐ là 18,811 UI/g cao hơn 1,53 lần với gạo ngâm không bổ sung (12,069 UI/g). Theo kết quả phân tích, hoạt tính enzyme của gạo ngâm không bổ sung thấp hơn so với các mẫu gạo có bổ sung acid glutamic vào dịch ngâm. So sánh với kết quả phân tích GABA cho thấy, hàm lượng GABA của hai giống gạo cũng đạt hàm lượng cao nhất khi bổ sung vào dịch ngâm acid glutamic với nồng độ 0,6%. Kết quả này phù hợp với kết quả phân tích hoạt động GAD khi bổ sung acid glutamic nồng độ 0,6% , hàm lượng GABA sinh ra tỉ lệ thuận với hoạt động của enzyme. Do đó, việc bổ sung acid glutamic vào dịch ngâm với nồng độ nhất định có ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme GAD.

Bảng 3: Ảnh hưởng của acid glutamic trong quá trình ngâm đến hoạt tính GAD

Acid Glutamic	Giống IR50404		Giống Một Bụi Đỏ	
	Hàm lượng acid glutamic (mg%)	Hoạt tính enzyme GAD (UI/g)	Hàm lượng acid glutamic (mg%)	Hoạt tính enzyme GAD (UI/g)
0	1410,150 ^c	15,475 ^c	1337,940 ^c	12,069 ^d
0,2	1396,610 ^c	15,954 ^c	1340,140 ^c	13,477 ^c
0,4	1520,350 ^b	17,853 ^b	1447,510 ^b	15,580 ^b
0,6	1659,600 ^a	20,148 ^a	1528,360 ^a	18,811 ^a

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát ở độ tin cậy 95%

Ngoài việc có ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme GAD, thì việc bổ sung hàm lượng acid glutamic vào dịch ngâm cũng làm thay đổi hàm lượng acid glutamic trong gạo ngâm. Kết quả ở Bảng 3 cũng cho thấy, hàm lượng acid glutamic ở hai giống đều đạt cao nhất tại nồng độ acid glutamic bổ sung vào dịch ngâm là 0,6%, hàm lượng acid glutamic của gạo tại nồng độ này cũng cao hơn so với các nồng độ khác cũng như gạo ngâm không bổ sung. Đối với giống IR50404, hàm lượng acid glutamic khi bổ sung nồng độ acid glutamic 0,6% vào là 1659,600 mg/100g, cao hơn 1,17 lần so với gạo không bổ sung. Tương tự, giống MBĐ cũng đạt hàm lượng acid glutamic là 1558,360 mg/100g tại nồng độ 0,6% và cao hơn 1,14 lần so với gạo ngâm không bổ sung. Hàm lượng acid glutamic của gạo tăng lên là do khi acid glutamic hòa tan vào dịch ngâm sẽ được gạo hấp thu vào, bên cạnh đó acid glutamic được hình thành từ việc phân giải các protein tạo thành các acid amin tự do của các protease trong quá trình ngâm cũng như được tổng hợp từ hai enzyme glutamate synthetase và glutamate synthase (Paidand *et al.*, 2013). Kết quả phân tích cho thấy, việc bổ sung acid glutamic vào

dịch ngâm có ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme GAD và hàm lượng acid glutamic trong gạo, từ đó ta xác định được 0,6% là nồng độ thích hợp để bổ sung vào dịch ngâm và để tiến hành thí nghiệm ủ này mầm tiếp theo.

3.2.3 Xác định nồng độ dịch cám tối ưu bổ sung vào dịch ngâm

Cám gạo là phụ phẩm của quá trình sản xuất gạo trắng. Trong cám gạo có rất nhiều thành phần dinh dưỡng như protein, chất béo, chất khoáng, vitamin và đặc biệt chủ yếu là γ -oryzanol, đây là một chất có tác dụng chống oxy hóa rất tốt, giảm hàm lượng cholesterol trong máu (Miller và Engel, 2006). Chính vì chứa nhiều thành phần dinh dưỡng và với giá thành rẻ nên đã có rất nhiều nghiên cứu về cám gạo, (trong đó có nghiên cứu của Takashi *et al.*, 2009) đưa ra một phương pháp sản xuất GABA một cách đơn giản bằng cách sử dụng cám đại mạch có bổ sung glutamate rất hiệu quả. Do đó, mục đích của thí nghiệm này nhằm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung dịch cám vào dịch ngâm đến hàm lượng GABA trong gạo trong quá trình ngâm.

Bảng 4: Ảnh hưởng của dịch cám trong quá trình ngâm đến hàm lượng acid glutamic và GAD của 2 giống lúa

Dịch cám gạo	Giống IR50404		Giống Một Bụi Đỏ	
	Hàm lượng acid glutamic (mg%)	Hoạt tính enzyme GAD (UI/g)	Hàm lượng acid glutamic (mg%)	Hoạt tính enzyme GAD (UI/g)
0	1410,150 ^{ab}	15,475 ^a	1337,940 ^{ab}	12,069 ^{ab}
3	1403,140 ^b	14,423 ^a	1335,030 ^b	12,057 ^b
5	1407,300 ^{ab}	15,462 ^a	1337,600 ^{ab}	12,070 ^{ab}
7	1416,880 ^a	15,481 ^a	1341,520 ^a	12,113 ^a

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát ở độ tin cậy 95%

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy, khi bổ sung dịch cám với các mức nồng độ khác nhau thì hoạt tính enzyme và hàm lượng acid glutamic ở cả hai giống lúa không có sự khác biệt ý nghĩa với mẫu gạo ngâm không bổ sung. Gạo ngâm trong dung dịch ngâm pH tối thích có bổ sung dịch cám làm tăng hoạt tính enzyme so với gạo nguyên liệu (IR50404 là 1,179 UI/g; MBĐ là 1,279 UI/g) nhưng nếu so với gạo ngâm trong pH ngâm tối ưu không bổ sung thì không có sự khác biệt. Bảng 4 cho thấy, khi bổ sung dịch cám với nồng độ 7% thì hoạt tính enzyme ở giống lúa IR 50404 là 15,481 UI/g (gạo ngâm không bổ sung là 15,475 UI/g); đối với giống MBĐ là 12,113 UI/g (gạo không bổ sung cám là 12,069 UI/g). Tương tự như với hoạt tính enzyme, hàm lượng acid glutamic của gạo ngâm có bổ sung dịch cám cũng không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê mức 5% so với gạo ngâm ở pH tối ưu không bổ

sung. Qua Bảng 4 có thể thấy, hàm lượng acid glutamic của gạo ngâm có bổ sung cám với nồng độ 7% của giống IR50404 là 1416,880 mg%; MBĐ là 1341,520 mg% không cao hơn so với hàm lượng glutamic của gạo không bổ sung lần lượt của giống IR50404, MBĐ là: 1410,150 mg%; 1337,940 mg%. Như vậy, kết quả trên cho thấy hàm lượng acid glutamic và hoạt tính enzyme trong gạo tăng lên chủ yếu là do ảnh hưởng của pH, còn việc bổ sung cám vào dịch ngâm không có ảnh hưởng đáng kể.

3.3 Ảnh hưởng của thời gian ủ đến hàm lượng acid glutamic và enzyme GAD của 2 giống lúa

Theo kết quả nghiên cứu của Komatsuzaki *et al.* (2007), hàm lượng acid glutamic trong gạo đã qua quá trình nảy mầm giảm so với gạo lứt không

nảy mầm. Trong quá trình nảy mầm, sự kích hoạt của các enzyme nội bào có trong hạt giúp phân giải protein để tạo thành các hợp chất khác nhau. Acid glutamic là một amino acid phi protein được enzyme GAD xúc tác khử nhóm carboxyl tạo thành GABA và CO₂. Sự tổng hợp GABA trong quá trình nảy mầm làm hàm lượng acid glutamic giảm. Nghiên cứu của Shahin *et al.* (2009), hàm lượng acid glutamic trong mầm gạo là tương đối cao hơn so với các phần khác trong hạt gạo. Kết quả ở Bảng 5 cho thấy ở điều kiện ủ là 37 °C, 0% CO₂ thì hàm lượng acid glutamic trong gạo sau khi nảy mầm gạo giảm theo thời gian. Hàm lượng acid glutamic của cả hai giống lúa sau nảy mầm đều đạt cao nhất tại thời điểm nảy mầm là 20 giờ. Theo kết quả thống kê, thời gian đầu từ 20 giờ đến 28 giờ thì hàm lượng axit glutamic giảm nhanh. Gạo nảy

mầm được bổ sung acid glutamic có hàm lượng giảm nhanh hơn so với gạo không được bổ sung và bổ sung cám. Sau 28 giờ nảy mầm thì hàm lượng acid glutamic giảm xuống thấp nhất ở cả hai giống lúa, đặc biệt là với gạo nảy mầm được bổ sung acid glutamic. Hàm lượng acid glutamic của gạo bổ sung acid glutamic ở 28 giờ nảy mầm với giống lúa IR50404 là 825,308 mg% (so với gạo không bổ sung là 883,715 mg%; gạo bổ sung cám là 874,262 mg%), giống MBĐ là 758,223 mg% (so với gạo không bổ sung là 790,761 mg%; gạo bổ sung cám là 788,596 mg%). Giai đoạn đầu của quá trình nảy mầm từ 20 giờ đến 28 giờ enzyme GAD được kích hoạt, quá trình tổng hợp GABA từ acid glutamic được diễn ra mạnh mẽ làm hàm lượng acid glutamic trong gạo mầm giảm nhanh chóng.

Bảng 5: Hàm lượng acid glutamic và hoạt tính enzyme GAD sau khi ủ yếm khí ở 37 °C

Thời gian ủ	Giống IR50404						Giống Một Bụi Đò					
	Hàm lượng acid glutamic (mg%)			Hoạt tính enzyme GAD (UI/g)			Hàm lượng acid glutamic (mg%)			Hoạt tính enzyme GAD (UI/g)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
20	1032,6 ^a	970,8 ^a	1046,7 ^a	26,1 ^c	29,0 ^c	25,9 ^c	947,8 ^a	903,4 ^a	946,1 ^a	23,9 ^c	26,7 ^c	23,9 ^c
24	978,6 ^b	872,9 ^b	978,4 ^b	29,9 ^b	35,9 ^b	29,0 ^b	882,2 ^b	815,6 ^b	878,1 ^b	26,6 ^b	32,9 ^b	26,2 ^b
28	883,7 ^c	825,3 ^c	874,3 ^c	34,9 ^a	37,1 ^a	33,9 ^a	790,8 ^c	758,2 ^c	788,6 ^c	32,0 ^c	34,5 ^a	31,7 ^a

Ghi chú: A: pH ngâm tối thích (IR50404 là pH=5, Một Bụi Đò là pH=4); B: Dịch ngâm ở pH tối thích có bổ sung acid glutamic (0,6%); C: Dịch ngâm ở pH tối thích có bổ sung 7% dịch cám

Trong gạo nguyên liệu hoạt tính enzyme GAD rất thấp vì độ ẩm trong hạt thấp, hạt đang ở trạng thái ngủ nên enzyme chưa được kích hoạt. Hoạt tính enzyme GAD thay đổi suốt trong quá trình nảy mầm vì trong quá trình nảy mầm có sự hấp thu nước làm độ ẩm trong hạt tăng lên, kích hoạt enzyme GAD hoạt động để tổng hợp GABA từ acid glutamic (Paidang *et al.*, 2014). Theo kết quả ở Bảng 5, hoạt tính enzyme GAD của hai giống lúa đều tăng nhanh trong quá trình nảy mầm và đạt cao nhất khi cho nảy mầm ở điều kiện nồng độ CO₂ 0% với thời gian nảy mầm ở cả hai giống nếp là 28 giờ. Trong khoảng thời gian từ 20 giờ đến 28 giờ, hoạt tính enzyme tăng lên mạnh mẽ vì đây là thời gian đầu của quá trình nảy mầm enzyme mới được kích hoạt và tăng hoạt tính nhanh chóng. Đối với giống IR50404, hoạt tính enzyme GAD đạt giá trị cao nhất 37,108 UI/g khi cho nảy mầm có bổ sung acid glutamic với thời gian nảy mầm là 28 giờ, cao hơn so với gạo nảy mầm không bổ sung (hoạt tính enzyme là 34,963 UI/g) và bổ sung cám (hoạt tính enzyme là 33,953 UI/g) cùng thời gian nảy mầm; hoạt tính enzyme cũng tăng 31,47 lần so với nguyên liệu ban đầu (nguyên liệu có hoạt tính enzyme GAD là 1,179 UI/g). MBĐ hoạt tính enzyme đạt cực đại 34,527 UI/g khi cho nảy mầm ở điều kiện 0% CO₂, có bổ sung acid glutamic và

thời gian nảy mầm là 28 giờ; sau nảy mầm, hoạt tính enzyme tăng 26,99 lần so với nguyên liệu (nguyên liệu MBĐ có hoạt tính enzyme GAD là 1,279 UI/g). Kết quả thống kê cho thấy, cả giống IR50404 và MBĐ hoạt tính enzyme GAD đạt giá trị cao nhất ở gạo mầm có bổ sung acid glutamic và thời gian nảy mầm 28 giờ. Trong quá trình nảy mầm của hạt gạo, một lượng lớn khí CO₂ được tạo ra do quá trình tổng hợp GABA sẽ kèm theo sự tiêu thụ ion H⁺ thông qua việc decarboxyl hóa do hoạt động của enzyme GAD khử nhóm carboxyl của acid glutamic để tổng hợp GABA và sinh ra CO₂, lượng CO₂ tăng lên cũng do quá trình hô hấp trong hạt lấy oxy và nhả CO₂. Theo nghiên cứu của Crawford *et al.* (1994), ở điều kiện yếm khí, pH nội bào sẽ giảm một khoảng từ 0,4 - 0,8 do stress gây ra bởi sự thiếu hụt oxy, điều này sẽ kích thích quá trình hoạt động của enzyme GAD. Dựa trên kết quả phân tích hàm lượng GABA cùng với sự gia tăng hoạt tính enzyme GAD thì hàm lượng GABA được tổng hợp cũng tăng theo tỉ lệ thuận.

4 KẾT LUẬN

Nhìn chung, 2 giống MBĐ và IR50404 đều có xu hướng bị tác động bởi acid glutamic và dịch cám là giống nhau. Tuy nhiên, chỉ có acid glutamic là có tác động đến việc gia tăng hạt tính GAD trong

suốt quá trình ngâm và nảy mầm của hai giống lúa. Kết quả của nghiên cứu này đã chỉ ra rằng: có thể thúc đẩy quá trình tổng hợp GABA thông qua hoạt động của enzyme GAD trong sản xuất gạo mầm khi bổ sung 0,6% acid glutamic trong giai đoạn ngâm. Ngược lại, dịch cám lại không có ảnh hưởng nhiều đến hoạt tính GAD, vì vậy sẽ khó có thể thúc đẩy sự tổng hợp GABA trong quá trình sản xuất gạo mầm GABA.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn sự tài trợ về kinh phí nghiên cứu trong khuôn khổ đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số B2014-16-34.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Banchuen J., Thammarutwasik P., Ooraikul B., Wuttijumnong P., and Sirivongpaisal P. 2010. Increasing the bio-active compounds contents by optimizing the germination conditions of Southern Thai brown rice. *Songklanarin J. Sci. Technol*, 32(3): 219-230.

Bello M., Tolaba M. P. and Suarez C. 2004. Factors affecting water uptake of rice grain during soaking. *Lebensm Wiss Technol*, 37: 811-816.

Chungcharoen T., Prachayawarakon S., Tungtrakul P., and Soponrorarit. 2015. Effect of germination time and drying temperature on drying characteristics and quality of germinated paddy. *Food and bioproducts processing*, 94:707-716.

Crawford L. A., Bown A. W., Breitkreuz K. E. and Guinel F. C. 1994. The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiol*, 104: 865 – 871.

Dinesh B.P., Subhasree R.S., Bhakayaraj R. and Vidhyalakshmi R., 2009. Brown rice-Beyond the Color Reviving a Lost health Food – A review. *American- Eurasian Journal of Agronomy*, 2 (2): 67-72.

Khwanchai P., Chinprahast N., Pichyangkura R., and Chaiwanichsiri S. 2014. Gamma-Aminobutyric Acid and Glutamic Acid Contents, and the GAD Activity in Germinated Brown Rice (*Oryza sativa* L.) Effect of Rice Cultivars. *Food Sci. Biotechnol*, 23(2): 373-379.

Komatsuzaki N., Tsukahara K., Toyoshima H., Suzuki T., Shimizu N. and Kimura T. 2007. Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. *Journal of Food Engineering*, 78: 556 - 560.

Lê Ngọc Tú, La Văn Chử, Đặng Thị Thu, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lê Doãn Diên. 2005. Hóa sinh công nghệ. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

Lê Nguyễn Đoàn Duy, Nguyễn Công Hà. 2014. Influence of soaking and germination conditions on the γ -aminobutyric acid (GABA) content of 2 rice varieties (IR50404 and Jasmine 85) from

Mekong delta. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 2014, tập 12, số 1: 59-64.

Miller, A. and K. H. Engel. 2006. Content of gamma oryzanol and composition of steryl ferulates in brown rice (*Oryza sativa* L.) of European origin. *J. Agri. Food Chem*, 54: 8127-8133.

Nguyễn Thị Hiền (chủ biên). 2006. Công nghệ sản xuất mì chính và các sản phẩm lên men cổ truyền. Trường Đại Học Bách khoa Hà Nội. NXB Khoa học và Kỹ thuật.

Ohtsubo, S., Asano, S., Sato, K., & Matsumoto, I. 2000. Enzymatic production of γ -aminobutyric acid using rice (*Oryza sativa*) germ. *Food Science and Technology Research*, 6(3): 208–211.

Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai H., Saikusa, T. and Horio, T. 2000. Effect of defatted rice germ enriched with GABA for sleepless, depression, autonomic disorder by oral administration. *Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi*, 47(8): 596-603.

Paidang K., Ninnart C., Rath P., and Saiwarun C. 2014. Gamma-Aminobutyric Acid and Glutamic Acid Contents, and the GAD Activity in Germinated Brown Rice (*Oryza sativa* L.) Effect of Rice Cultivars. *Food Sci. Biotechnol*. 23(2): 373-379.

Patil, S. P., and Khan, M. K. 2011. Germinated brown rice as a value added rice product: A review. *J Food Sci Technol*, 48(6):661–667.

Qian Z., Jun X., Lizhen Z., Xiaofeng Z., Jochem E., Wopke van der W., Liusheng D.. 2014. Optimizing soaking and germination conditions to improve gamma-aminobutyric acid content in japonica and indica germinated brown rice. *Journal of functional foods*, 10: 283–291.

Shahin R., Hamed M., Nazamid S., Shuhaimi M., Ismail A., Anis S.M.H., Azizah H., Mohd Y.M. 2009. Evaluation of GABA, crude protein and amino acid composition from different varieties of Malaysian's brown rice. *Australian Journal of Crop Science*, 3(4):184-190.

Spies J. R. 1957. Colorimetric procedures for amino acids. *Methods in enzymology*, vol. III (Colowick S. P., and Kalpan N. O., eds.). Academic Press, NY, 476-571.

Takashi I., Makoto K., Naohiko H., Tiansu Z., Katsuhiro H., Kazutoshi I. 2009. A method for production of γ -amino butyric acid (GABA) using barley bran supplemented with glutamate. *Food Research International*, 42: 319–323.

Tian, S., Nakamura, K., and 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.

Trung P. Q., Tien N. P., Duy L. N. D., Ha N. C. 2016. Changes of Chemical properties and Functional Compounds during the Germination of Various Brown Rice in Mekong Delta, Viet Nam. *The 18th Food Innovation Asia*

- Conference 2016 (FIAC 2016) - Food Research and Innovation for Sustainable Global Prosperity, 16-18 June 2016. 223-230.
- Tsushida T and Murai T. 1987. Conversion of glutamic acid to γ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions. *Agric Biol Chem*, 51: 2805-2871.
- You T. L, Cheng C. P, Shwo T. W and Chi Y. C. 2015. Effects of different germination condition on antioxidative properties and bioactive compounds of germinated brown rice. *Hindawi Publishing Corporation. Biomed Reseach International*, 2015: 1-10.
- Zhang, H., Yao, H., Chen, F., and Wang, X. 2006. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ. *Food Chemistry*, 101: 1670–1676.