وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات برنج کشور

نشریه‌ی فنی

اصلاح روش اندازه گیری میزان آمیلوز در دانه برنج بر اساس روش ایزو ۶۶۴۷

نگارندگان:

دکتر فاطمه حبیبی
عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات برنج کشور
مهندس میترا یکتا، مهندس فردوس عادلی، مهندس مریم فروغی
مهندس لادن نوری، مهندس طاهره محسنی
محققین موسسه تحقیقات برنج کشور

۱۳۹۳

نشریه‌ی شماره ی ۶

Ministry of Jihad-e-Agriculture
Agricultural Research, Education and Extension Organization
Rice Research Institute of Iran

Improvevent of Measuring Method for Amylose Content in Rice Grain Based on Iso-6647

By:

Fatemeh Habibi
Member of Scientific Board,
Rice Research Institute of Iran, Rasht, Iran
Mitra Yekta, Ferdows Adeli, Maryam Foroughi,
Ladan Nouri, Tahereh Mohseni
Researchers of
Rice Research Institute of Iran, Rasht, Iran

2014

Number 6

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات برنج کشور

اصلاح روش اندازه‌گیری میزان آمیلوز در دانه‌ی برنج بر اساس روش ایزو ۶۶۴۷

نگارندگان:

دکتر فاطمه حبیبی
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات برنج کشور
مهندس میترا یکتا، مهندس فردوس عادلی مسبب، مهندس مریم فروغی،
مهندس لادن نوری، مهندس طاهره محسنی
محققین موسسه تحقیقات برنج کشور

۱۳۹۳

حق چاپ برای موسسه‌ی تحقیقات برنج کشور محفوظ است.

انتشارات موسسه تحقیقات برنج کشور

عنوان نشریه: اصلاح روش اندازه‌گیری میزان آمیلوز در دانه‌ی برنج بر اساس روش ایزو ۶۶۴۷

نگارندگان: فاطمه حبیبی، میترا یکتا، فردوس عادلی مسبب، مریم فروغی، لادن نوری، طاهره محسنی

ناشر: انتشارات موسسه تحقیقات برنج کشور

ویراستاران علمی: کبری تجددی‌طلب و فاطمه توسلی

ویراستار ادبی: مهدی جلائیان

صفحه آرایی: شهربانو حمیدزاده

طراحی جلد: محمدرضا عابدینی

چاپ اول: ۱۳۹۳

تیراژ: ۱۰۰۰ نسخه

قیمت: ۱۵۰۰ تومان

شماره‌ی ثبت: ثبت در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به شماره‌ی۴۵۵۲۸ و تاریخ ۹۳/۴/۲۳ می‌باشد.

نشانی: رشت، کیلومتر ۵ جاده تهران، موسسه تحقیقات برنج کشور، صندوق پستی: ۱۶۵۸، کد پستی: ۱۳۴۷۵-۴۱۹۹۶
تلفن: ۶۶۹۰۰۵۲، نمابر: ۶۶۹۰۰۵۱، وب‌سایت: http://berenj.areo.ir

مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

۱- مقدمه ۳
۲- روش جدید اندازه‌گیری میزان آمیلوز در دانه‌ی برنج ۷
۳- مقایسه‌ی روش قدیمی و جدید اندازه‌گیری آمیلوز ۱۰
۴- معایب روش قدیمی ۱۱
۵- تفاوت روش جدید اندازه‌گیری آمیلوز با روش قدیمی ۱۱
۶- محاسن روش جدید ۱۳
منابع ۱۴

۱– مقدمه

مهم‌ترین عامل تاثیرگذار بر کیفیت پخت برنج مربوط به خواص نشاسته است که ۹۰ درصد وزن خشک برنج سفید را تشکیل می‌دهد (Sasaki *et al*., 2000). نشاسته ترکیبی از دو همو پلیمر به نام‌های آمیلوز و آمیلوپکتین می‌باشد. محتوای آمیلوز مهم‌ترین پارامتر شیمیایی دانه‌ی برنج است که با بافت و خواص حسی برنج پخته شده ارتباط دارد. در بازارهای مختلف برای انتخاب هر رقم معیارهای خاصی در نظر گرفته می‌شود که بر پایه‌ی ذایقه‌ی مصرف‌کننده استوار است (حبیبی، ۱۳۹۲). بنابراین در برنامه‌های تحقیقاتی و اصلاحی برنج نیاز است روشی روشن و بدون ابهام برای اندازه‌گیری شاخص‌های کیفیت به منظور اصلاح و معرفی ارقام جدید در بازار ارایه گردد به طوری‌که قبل از معرفی ارقام جدید این اطمینان وجود داشته باشد که ارقام جدید توسط کشاورزان مورد استقبال قرار گرفته و توسط مصرف‌کننده پذیرفته می‌شود. تعیین درصد آمیلوز در مراحل اول برنامه‌های توسعه‌ی برنج، اصلاح‌گران را قادر می‌سازد تا در طول روند معرفی رقم، از ابتدا دانه‌ای با کیفیت قابل پذیرش را پایه‌گذاری کنند. هر نوع اصلاح و بهبود در اندازه‌گیری و درک آمیلوز، محققین و اصلاح‌گران برنج را قادر خواهد ساخت که از میزان آمیلوز برای پیش‌بینی و درک بهتر کیفیت پخت برنج استفاده کنند.

بیش از نیم قرن اعتقاد بر این است که میزان آمیلوز می‌تواند ماهیت بافت برنج پخته شده را توضیح دهد. برنج‌های پخته شده با آمیلوز بالا (بیشتر از ۲۵ درصد) به نسبت خشک و جدا از هم هستند. برنج‌های با آمیلوز پایین (کم‌تر از ۲۰ درصد) در هنگام پخت چسبنده می‌شوند و برنج‌های با آمیلوز متوسط (۲۵-۲۰ درصد) تا مدت‌ها پس از پخت نرم باقی می‌مانند (Kumar & Khush, 1986). به طور کلی هر چه میزان آمیلوز بیشتر باشد برنج پخته شده در هنگام پخت خشک‌تر، دارای قابلیت جویدن بالاتر و دانه دانه‌تر است. با این حال با گذشت زمان و تولید انواع بیشتری از برنج با صفات مختلف و افزایش جهانی تبادل ژرم پلاسم، مشخص شده است که آمیلوز همیشه در پیش‌بینی خواص پخت موثر نیست به طوری که ارقامی با محتوای آمیلوز مشابه میزان خشکی یا نرمی متفاوتی را پس از پخت نشان داده‌اند. این تنها برخی از دلایلی است که محققین را به فکر فرو برده و منجر شده است که مطالعات متعددی را در ارتباط با نقش آمیلوز در پیش‌بینی کیفیت پخت انجام دهند (Fitzgerald *et al*., 2009). با وجود این مشکل، در برنامه‌های ارزیابی کیفیت برنج در سراسر جهان، همچنان به میزان آمیلوز به عنوان مهم‌ترین معیار برای انتخاب و توسعه‌ی لاین‌ها از نظر خواص حسی مورد پذیرش در بازار تکیه می‌کنند. در موسسه‌ی تحقیقات بین‌المللی برنج[1]، تعداد نمونه‌های

1- International Rice Research Institute (IRRI)

برنج از ۸۰۰۰ نمونه در سال ۲۰۰۷ به ۲۱۰۰۰ نمونه در سال ۲۰۱۰ افزایش پیدا کرده است (Jimenez *et al*., 2010).

بدیهی است برای مطالعه‌ی کیفیت ژرم‌پلاسم در برنامه‌های اصلاح برنج نیاز است مواردی که موجب سردرگمی می‌شوند رفع گردند. در سال ۲۰۱۲ با همکاری ایزو و شبکه‌ی بین‌المللی کیفیت برنج روشی برای اندازه‌گیری میزان آمیلوز در دانه‌ی برنج منتشر گردید (ایزو ۶۶۴۷). در این روش سعی شده است عواملی که باعث ایجاد خطا در اندازه‌گیری میزان آمیلوز می‌شوند به حداقل برسد. در این راستا تعداد ۳۶ نمونه ار ژرم‌پلاسم برنج ایرانی کشت شده در موسسه‌ی تحقیقات برنج کشور انتخاب و میزان آمیلوز بر اساس روش قدیمی و معمول آزمایشگاه کیفیت (Juliano, 1971) و روش جدید، اندازه‌گیری و مقایسه گردید. نتایج در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱- مقایسه‌ی محتوای آمیلوز به دست آمده از روش قدیمی (Juliano, 1971) و روش جدید (ایزو ۶۶۴۷)

ردیف	نام رقم	درصد آمیلوز (روش جدید)	درصد آمیلوز (روش قدیمی)
۱	سپیدرود	۲۲/۷	۲۶/۹
۲	غریب سیاه ریحانی	۱۲/۸	۱۹/۱
۳	هاشمی	۱۴/۱	۲۰/۷
۴	علی‌کاظمی	۱۲/۳	۱۸/۴
۵	دم‌سیاه	۱۵/۸	۲۲/۴
۶	طارم محلی	۱۴/۵	۲۰/۳
۷	سالاری	۱۵/۳	۲۱/۵
۸	نعمت	۲۳/۱	۲۸
۹	طارم امیری	۱۵/۹	۲۲/۳
۱۰	خزر	۱۸/۵	۲۳/۸
۱۱	دشت	۲۳/۶	۲۸
۱۲	موسی طارم	۱۵/۶	۲۰/۸
۱۳	ندا	۱۹/۳	۲۵/۸
۱۴	درفک	۱۷/۴	۲۱/۹
۱۵	کادوس	۱۷/۲	۲۲/۹
۱۶	دم سفید	۱۴/۴	۲۰/۱
۱۷	حسن‌سرائی	۱۴/۵	۲۱

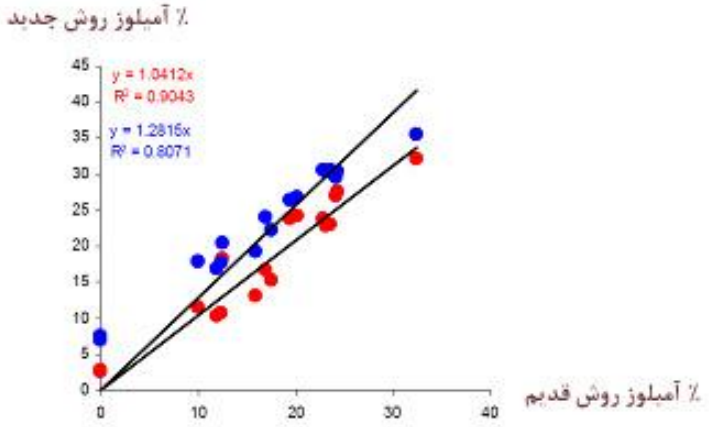
جدول۱ (ادامه)- مقایسه‌ی محتوای آمیلوز به دست آمده از روش قدیمی (Juliano, 1971) و روش جدید (ایزو ۶۶۴۷)

ردیف	نام رقم	درصد آمیلوز (روش جدید)	درصد آمیلوز (روش قدیمی)
۱۸	سنگ جو	۱۵/۴	۲۰/۹
۱۹	دم زرد	۱۵/۲	۲۱
۲۰	طارم منطقه	۱۴/۲	۲۰/۸
۲۱	دیلمانی	۱۴/۶	۲۱/۱
۲۲	بی‌نام	۱۴/۸	۲۱/۴
۲۳	اهلمی طارم	۱۵/۴	۲۰/۹
۲۴	بجار	۲۱	۲۷/۱
۲۵	غریب	۱۴/۳	۲۱/۲
۲۶	محمدی	۲۲/۳	۲۶/۹
۲۷	حسنی	۱۵/۵	۲۱/۵
۲۸	صالح	۲۳	۲۸
۲۹	گرده	۱۶/۵	۲۲/۸
۳۰	چمپا بودار	۲۱/۵	۲۷
۳۱	آمل ۲	۲۱	۲۶/۹
۳۲	صدری	۱۵/۴	۲۱/۹
۳۳	موسی طارم	۱۴/۱	۲۰/۹
۳۴	آمل ۳	۲۵/۳	۲۹/۸
۳۵	خزر (خریداری از بازار)	۱۹	۲۳/۴
۳۶	گوهر	۲۱/۳	۲۵/۴

همان‌گونه که در نتایج جدول ۱ مشخص است مقدار آمیلوز در روش جدید پایین‌تر از روش قدیمی می‌باشد. نشاسته‌ی برنج متشکل از دو جزء آمیلوز و آمیلوپکتین است. در برنامه‌های تحقیقاتی برای انتخاب لاین‌ها از نظر کیفیت پخت مطلوب فقط میزان آمیلوز را در نظر می‌گیرند. در اندازه‌گیری میزان آمیلوز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر از خاصیت تغییر رنگ نشاسته در مجاورت ید استفاده شده و میزان جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر محاسبه می‌گردد. آمیلوپکتین که بخش عمده‌ای از نشاسته‌ی برنج را تشکیل می‌دهد نیز می‌تواند با ید کمپلکس رنگی تولید نماید. کمپلکس آمیلوپکتین- ید ممکن است در محاسبه‌ی جذب در یک طول موج مشخص دخالت کند. بنابراین می‌تواند به عنوان منبع مهمی از خطا باشد. اگر چه کمپلکس آمیلوز – ید یک رنگ آبی تند

و پایدار ایجاد می‌کند که حداکثر جذب آن در ۶۲۰ نانومتر است، کمپلکس آمیلوپکتین- ید که رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز است و در طول موج‌های بالاتر جذب کم‌تری دارد و ممکن است با گذشت زمان از بین برود و در طول موج‌های بالاتر ناپایدارتر نیز می‌باشد. در روش جدید با به کار بردن طول موج‌های مختلف در هنگام قرائت آمیلوز با دستگاه اسپکتروفتومتر و انتخاب بهترین طول موج (۷۲۰ نانومتر) مشارکت و مداخله‌ی آمیلوپکتین به حداقل رسانده شده است.

در تحقیقی که توسط جیمنز و همکاران (Jimenez *et al*., 2011) انجام شد مشخص گردید که درصد آمیلوز محاسبه شده در طول موج ۷۲۰ نانومتر پایین‌تر از درصد آمیلوز محاسبه شده در طول موج مورد استفاده در روش معمول (۶۲۰ نانومتر) بوده است (شکل ۱). این موضوع می‌تواند بیان‌گر مداخله‌ی آمیلوپکتین در هنگام اندازه‌گیری میزان آمیلوز در روش قدیمی باشد.



شکل۱– مقایسه‌ی مقادیر آمیلوز به دست آمده توسط روش جدید در دو طول موج ۷۲۰ (قرمز) و ۶۲۰ (آبی) نانومتر (Jimenez *et al*., 2011)

با توجه به تفاوت مشاهده شده در اندازه‌گیری میزان آمیلوز بر اساس روش جدید و همچنین لزوم هماهنگ بودن با روش استاندارد جهانی نیاز است که روش اندازه‌گیری آمیلوز در آزمایشگاه‌های کیفیت ایران نیز تجدید نظر گردد.

جدیدترین استاندارد جهانی در ارتباط با تعیین میزان آمیلوز برنج در استاندارد ایزو ۶۶۴۷-۱ و ایزو ۶۶۴۷-۲ چاپ شده است که بر اساس نتایج به دست آمده از اعضای شبکه‌ی بین‌المللی کیفیت برنج تجدید نظر شده است. در ادامه، روش جدید برای اندازه‌گیری میزان آمیلوز توضیح داده خواهد شد.

۲- روش جدید اندازه‌گیری میزان آمیلوز در دانه‌ی برنج

۱- مواد شیمیایی: از مواد شیمیایی با مارک معتبر استفاده گردد.

۱-۱- اتانول ۹۵٪

۱-۲- سدیم هیدروکسید ۱ مولار

۱-۳- استیک اسید ۱ مولار

۱-۴- محلول ید

دو گرم یدید پتاسیم را در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری وزن کرده و با افزودن مقدار کافی از آب مقطر، محلول اشباعی از آن به دست می‌آید. سپس ۰/۲ گرم ید به آن اضافه کرده و با همزن مغناطیسی هم زده تا کاملا حل گردد و سپس به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده می‌شود. به دلیل حفاظت از نور آن را در شیشه‌ی تیره قرار داده و یا با فویل آلومینیومی پوشانده و در جای تاریک قرار داده می‌شود.

۲- دستگاه‌ها و وسایل مورد نیاز:

۲-۱- اسپکتروفتومتر با سلول‌های مخصوص یک سانتی‌متری که قابلیت اندازه‌گیری جذب را در طول موج ۷۲۰ نانومتر داشته باشد.

۲-۲- بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری

۲-۳- حمام آب جوش

۲-۴- ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم

۲-۵- لوله‌های آزمایش ۲۰ میلی‌لیتری

۲-۶- پیپت‌هایی با گنجایش ۰/۲، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر

۳- روش کار:

۳-۱- تهیه نمونه‌های آزمایش: نمونه‌ها باید از قبل آرد شوند.

۳-۲- تهیه محلول های آزمون:

۳-۲-۱- ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه را در سه تکرار در بالن ژوژه‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری وزن کرده و با دقت، یک میلی‌لیتر اتانول را با پیپت به آن اضافه کرده و آهسته تکان داده تا نمونه‌ها کاملا مرطوب شوند.

۳-۲-۲- نه میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید یک مولار را به آن اضافه کرده و خوب مخلوط نموده تا نشاسته با حرارت در حمام آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه یا قرار دادن یک شب در محیط آزمایشگاه کاملا حل شود. پس از حرارت دادن در حمام آب جوش اجازه داده تا به دمای محیط برسد و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می‌شود.

۳-۳- تهیه‌ی محلول بلانک: محلولی با استفاده از یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری بدون نمونه و مطابق بند ۳-۲-۲ آماده می‌شود.

۳-۴- تهیه‌ی منحنی کالیبراسیون

۳-۴-۱- تهیه‌ی محلول‌های کالیبراسیون: محلول‌هایی از پنج نمونه‌ی برنج استاندارد که میزان آمیلوز آن‌ها مشخص است (درصد دقیق آمیلوز نمونه‌های استاندارد بر اساس روش کروماتوگرافی بر اساس اندازه می‌باشد) را بر اساس روش توضیح داده شده در بند ۳-۲ آماده شود (نیاز نیست که در سه تکرار انجام شود).

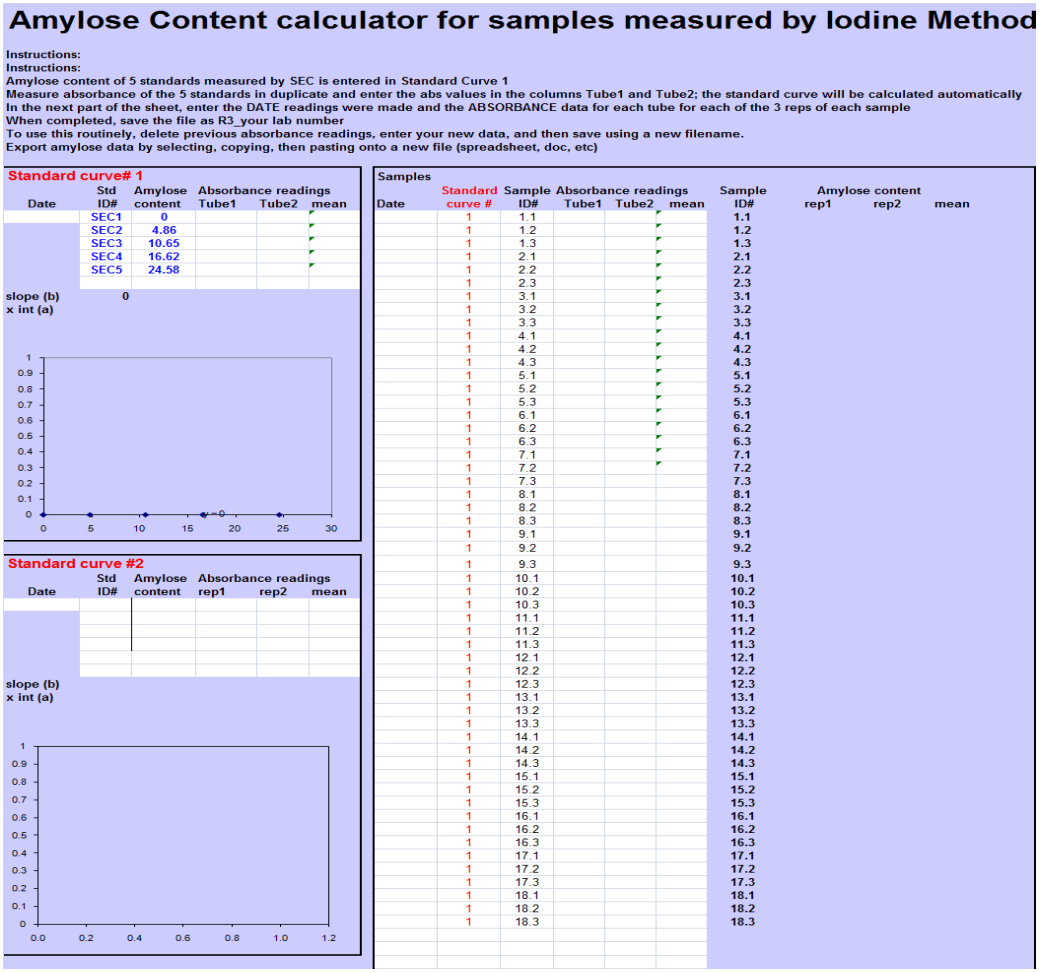
توضیح: مولکول‌های آمیلوز حاوی بیش از ۲۰۰ واحد گلوگز هستند که به صورت خطی با هم پیوند دارند. مولکول آمیلوپکتین شاخه‌هایی منشعب از واحدهای گلوکز است که حدوداً از ۱۰۰-۶ واحد گلوگز تشکیل یافته است. در روش کروماتوگرافی بر اساس اندازه‌ی زنجیرهای خطی نشاسته بر اساس حجم هیدرودینامیکی و وزن مولکولی از هم جدا می‌شوند. در عمل ابتدا آرد نمونه‌ی برنج توسط هیدروکسید سدیم ژلاتینه شده و مولکول‌های نشاسته توسط آنزیم ایزوآمیلاز شاخه زدایی می‌شوند (Ward *et al.*, 2006). درصد آمیلوز توسط روش کروماتوگرافی بر اساس اندازه جدا شده و نسبت زنجیرهای آمیلوز بر اساس سطح منحنی زیر پیک آمیلوز محاسبه می‌شود:

$$\left(\frac{\text{سطح زیرین پیک آمیلوز}}{\text{مساحت کل پیک نشاسته}} \right) \times ۱۰۰$$

۳-۴-۲- اندازه‌گیری میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر: ۰/۵ میلی‌لیتر از هر محلول کالیبراسیون را داخل دو لوله‌ی آزمایش ریخته و پنج میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۱ میلی‌لیتر اسید استیک و ۰/۲ میلی‌لیتر محلول ید به آن اضافه می‌شود. در نهایت ۴/۲ میلی‌لیتر آب

مقطر اضافه نموده تا حجم نهایی مخلوط واکنش به ۱۰ میلی‌لیتر برسد. سپس آن را به خوبی توسط ورتکس هم زده و مخلوط کرده و یا این‌که سر لوله‌ی آزمایش توسط پارافیلم پوشانده و با چند بار معکوس کردن لوله، محتویات آن به خوبی مخلوط می‌شود. جذب را در طول موج ۷۲۰ نانومتر در برابر محلول شاهد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بلافاصله بعد از افزودن آخرین ماده‌ی شیمیایی خوانده خواهد شد.

۳-۴-۳- ترسیم منحنی کالیبراسیون: از برنامه‌ی Amylose Calculator (شکل ۲) که توسط شبکه‌ی بین‌المللی کیفیت ارایه شده استفاده می‌شود. در قسمت مربوط به استاندارد پس از وارد کردن جذب محلول‌های کالیبراسیون در ستون دوم اعداد آمیلوز که توسط روش SEC به دست آمده و مشخص است وارد می‌شود.



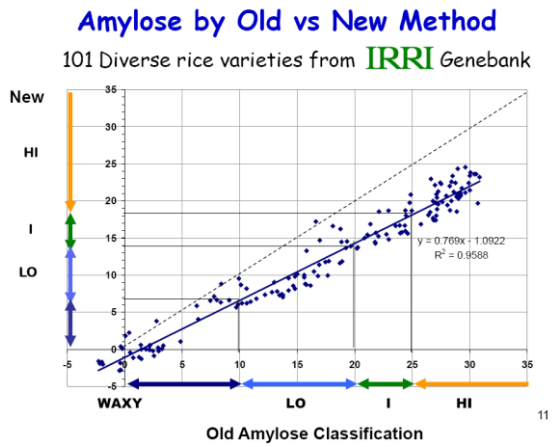
شکل۲- نرم افزار محاسبه‌ی خودکار میزان آمیلوز

۳-۵- تعیین میزان آمیلوز در نمونه‌های آزمون: ۰/۵ میلی‌لیتر از هر محلول مورد آزمون که مطابق بند ۳-۲-۲ تهیه شده در دو لوله‌ی آزمایش ریخته می‌شود. سپس پنج میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۱ میلی‌لیتر اسید استیک و ۰/۲ میلی‌لیتر محلول ید به آن اضافه می‌شود. در نهایت ۴/۲ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده تا حجم نهایی مخلوط واکنش به ۱۰ میلی‌لیتر برسد. سپس آن را به خوبی توسط ورتکس هم زده و مخلوط کرده و یا این‌که سر لوله‌ی آزمایش را توسط پارافیلم پوشانده و با چند بار معکوس کردن لوله محتویات آن به خوبی مخلوط خواهد شد. در نهایت جذب در طول موج ۷۲۰ نانومتر در برابر نمونه‌ی شاهد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بلافاصله بعد از افزودن آخرین ماده‌ی شیمیایی خوانده می‌شود. مقادیر جذب برای هر نمونه و هر تکرار در برنامه‌ی Amylose Calculator وارد می‌شود. این برنامه بر اساس منحنی استاندارد میزان آمیلوز را به طور خودکار محاسبه خواهد نمود.

۳- مقایسه‌ی روش قدیمی و جدید اندازه‌گیری آمیلوز

در روش جدید سعی بر این است که مداخله‌ی آمیلوپکتین به حداقل برسد و همچنین از استانداردهایی برای کالیبراسیون استفاده شود که مقادیر واقعی آمیلوز آن‌ها توسط روش‌های پیشرفته‌ای نظیر کروماتوگرافی بر اساس اندازه به دست آمده باشد. داده‌های گزارش شده از میزان آمیلوز ارقام برنج ایرانی بر اساس پنج استاندارد ارسالی (IR65, IR65/24, IR24, IR64, IR8) از موسسه‌ی بین‌المللی تحقیقات برنج در جدول ۱ نشان داده شده است.

در موسسه‌ی بین‌المللی تحقیقات برنج میزان آمیلوز در ۱۰۱ نمونه‌ی مختلف برنج مختلف بر اساس روش جدید اندازه‌گیری شد و نتایج با روش قدیمی مقایسه گردید. در شکل ۳ مقایسه‌ی میزان آمیلوز در ۱۰۱ رقم مختلف از بانک ژن موسسه‌ی بین‌المللی تحقیقات برنج آورده شده است. با توجه به پایین‌تر بودن مقادیر آمیلوز در روش جدید، طبقه‌بندی ارقام بر اساس میزان آمیلوز متفاوت خواهد بود.



شکل ۳- مقایسه‌ی میزان آمیلوز در ۱۰۱ رقم مختلف از بانک ژن موسسه‌ی بین‌المللی تحقیقات برنج (Jimenez *et al*., 2011)

۴– معایب روش قدیمی:

۱- داده‌های آمیلوز نمونه‌های مشابه گزارش شده از آزمایشگاه‌های مختلف سراسر جهان به خاطر تفاوت در نمونه‌های استاندارد مورد استفاده، تفاوت طول موج مورد استفاده در هنگام قرائت آمیلوز با دستگاه اسپکتروفتومتر و تفاوت در زمان انتظار پس از افزودن آخرین ماده‌ی شیمیایی و قرائت جذب بسیار متفاوت است. بنابراین فقدان یک روش واحد و استاندارد برای کلیه‌ی آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت برنج در سراسر دنیا احساس می‌شد.

۲- به خاطر یکسان نبودن نمونه‌های استاندارد مورد استفاده در کلیه‌ی آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت برنج، رسم منحنی کالیبراسیون یکسان برای مقایسه‌ی داده‌ها امکان پذیر نبود. به طور کلی در داده‌های گزارش شده از سه منحنی کالیبراسیون متفاوت استفاده می‌شد: ۱) آمیلوز خالص سیب‌زمینی، ۲) مخلوطی از آمیلوز و آمیلوپکتین خالص، ۳) ارقام برنج کالیبره شده. بیشترین خطا در نمونه‌هایی بود که در آن‌ها از آمیلوز خالص سیب‌زمینی استفاده می‌شد چون تخمین میزان آمیلوز در نمونه‌های برنج با استفاده از آمیلوز خالص نمی‌تواند مداخله‌ی دیگر اجزا در اندازه‌گیری جذب را نشان دهد.

به خاطر مشکلات حاصل از روش‌های مورد استفاده‌ی آزمایشگاه‌ها و به خاطر مناسب بودن روش کروماتوگرافی بر اساس اندازه[1] سبب شد که به عنوان یک روش جایگزین برای کالیبره نمودن و تعیین مقدار واقعی آمیلوز نمونه‌های استاندارد استفاده شود. همچنین این روش می‌تواند در آینده به عنوان یک مرجع استاندارد در برنامه‌های جهانی معرفی گردد. قابلیت اتصال ید با آمیلوز[2] در مارک‌های مختلف آمیلوز خالص متفاوت است. تاثیر این تفاوت در اندازه‌گیری میزان آمیلوز کاملا" مشخص و مشهود است. برای اجتناب از چنین موضوعی در روش استاندارد ایزو از پنج نمونه‌ی برنج که توسط روش کروماتوگرافی بر اساس اندازه کالیبره شده بودند به عنوان استاندارد استفاده شد.

۵– تفاوت روش جدید اندازه‌گیری آمیلوز با روش قدیمی

واضح است که استانداردهای جهانی باید با برنامه‌های ارزیابی کیفیت برنج در سراسر جهان هماهنگ باشند. اگرچه در برنامه‌های اصلاحی برنج برای پیشبرد نسل‌ها و لاین‌ها از ارقام بومی و محبوب با صفات حسی خاص به عنوان ارقام مرجع استفاده می‌شود، هنوز هم نیاز است معیار دقیقی برای برنج مرجع ارایه شود. مدت زیادی است که در اندازه‌گیری میزان آمیلوز به روش اتصال با ید،

1- Size Exclusion Chromatography (SEC)
2- Iodine Binding Capacity (IBC)

مداخله‌ی آمیلوپکتین مبهم مانده است. در مطالعات پایه مشخص شده که تعدادی از شاخه‌های آمیلوپکتین مشابه با زنجیرهای کوتاه آمیلوز با ید پیوند داده و در اندازه‌گیری میزان آمیلوز ایجاد خطا می‌کنند (Fitzgerald *et al.*, 2009). بنابراین باید در روش اندازه‌گیری آمیلوز تغییراتی صورت گیرد تا مداخله‌ی آمیلوپکتین به حداقل برسد. بررسی‌ها نشان داده که این تغییرات می‌تواند با ایجاد یک منحنی استاندارد جدید، طول موج متفاوت و زمان انتظار انجام شود. فن‌آوری‌های جدید روش‌های معتبری را برای تعیین اجزای آمیلوز و آمیلوپکتین پیشنهاد می‌کنند. یکی از آن روش‌ها استفاده از روش کروماتوگرافی بر اساس اندازه است (Cuevas *et al.*, 2010). این روش می‌تواند مولکول‌های بزرگ نشاسته را بر اساس اندازه یا سایر خصوصیات به ویژه حجم هیدرودینامیکی جدا کند. کروماتوگرافی بر اساس اندازه هم اطلاعات کیفی راجع به انتشار وزن مولکولی زنجیرهای نشاسته و هم تخمینی کمی در ارتباط با اجزای آمیلوز و آمیلوپکتین در اختیار قرار می‌دهد. هر چند حقایق به دست آمده از کروماتوگرافی بر اساس اندازه می‌تواند به پیشبرد درک واقعی از زنجیرهای نشاسته کمک کند اما با این حال در برنامه‌های اصلاحی و کارهای معمول و برای غربال‌گری معمول به علت آهسته بودن روش، نامناسب است. اما در یک شبکه سازمان یافته مانند شبکه‌ی بین‌المللی کیفیت برنج یا[1]، از آن می‌توان به عنوان یک ابزار کالیبراسیون برای اندازه‌گیری مقدار واقعی آمیلوز در نمونه‌های استاندارد و مرجع در برنامه‌های ارزیابی کیفیت استفاده نمود.

آمیلوپکتین پلیمر منشعب از واحدهای گلوکز است که باعث ایجاد چهارچوب بزرگ‌تری از نشاسته می‌شود (Witt *et al.*, 2012) و آمیلوز زنجیرهای بلند خطی است که فقط حداکثر ۳۰ درصد کل نشاسته را تشکیل می‌دهد. در روش جدید تعیین مقدار واقعی آمیلوز، هدف روش تلاش برای تمایز بین دو نوع نشاسته (آمیلوز و آمیلوپکتین) و کسب اطلاعات بیشتر در مورد ساختارهای مربوطه‌شان بود. در کروماتوگرافی بر اساس اندازه‌ی مولکول‌های آمیلوپکتین به خاطر انشعابات گسترده‌تر، دیرتر از ستون کروماتوگرافی خارج می‌شوند و زنجیرهای خطی آمیلوز (وزن مولکولی: تقریبا ۱۰۵) کوچک‌تر از مولکول‌های منشعب و سنگین آمیلوپکتین (وزن مولکولی: تقریبا ۱۰۸) هستند.

در روش جدید تعیین مقدار واقعی میزان آمیلوز، برای بهینه کردن روش بهترین طول موج برای به حداقل رساندن مداخله‌ی آمیلوپکتین و تعیین طول موج مربوط به کمپلکس ید- آمیلوپکتین صورت گرفته است. برای اطمینان از حداکثر تفکیک ید از آمیلوپکتین، زمان انتظار پس از افزودن آخرین ماده‌ی شیمیایی نیز بررسی و تجدید نظر شده است.

1- International Network for Quality of Rice (INQR)

۶- محاسن روش جدید

۱- به حداقل رساندن مداخله‌ی آمیلوپکتین در هنگام اندازه‌گیری آمیلوز با انتخاب طول موج مناسب

۲- استفاده از نمونه‌های استاندارد برنج که هم توسط روش‌های جدید کروماتوگرافی میزان آمیلوز دقیقشان مشخص و هم بر خلاف آمیلوز خالص سیب‌زمینی از نظر ترکیبات تشکیل دهنده، مشابه نمونه‌های مورد ارزیابی می‌باشند.

۳- بزرگ‌ترین فایده‌ی استفاده از روش جدید برای تعیین آمیلوز، هماهنگ بودن روش اندازه‌گیری آمیلوز در آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت برنج در سراسر دنیا است.

منابع

- حبیبی، ف. (۱۳۹۲). روش‌های آزمایشگاهی اندازه‌گیری ویژگی‌های کیفی دانه‌ی برنج (نشریه‌ی فنی). رشت: موسسه تحقیقات برنج کشور.
- Cuevas, R. P., Gilbert, R. G. & Fitzgerald, M. A. (2010). Structural differences between hot-water-soluble and hot-water insoluble fractions of starch in waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Carbohydrate Polymers*, 81: 524-32.
- Fitzgerald, M. A., Bergman, C. J., Resurreccion, A. P., Moller, J., Jimenez, R., Reinke, R. F., Martin, M., Blanco, P., Molina, F., Chen, M., Kuri, V., Romero, M. V., Habibi, F., Umemoto, T., Jongdee, S., Graterol, E., Reddy, K. R., Bassinello, P. Z., Rajeswari, S., Rani, N. S., Sanjukta, D., Wang, Y., Indrasari, S. D., Asfaliza, R., Rauf, A., Dipti, S. S., Xie, L., Lang, N. T., Singh, P., Toro, D. C., Tavasoli, F. & Mestres, C. (2009). Addressing the Dilemmas of Measuring Amylose in Rice. *Cereal Chemistry*. 86(5): 492-498.
- International Organization for Standardization .(2011). ISO/DIS 6647-1, Rice—Determination of amylose content—Part 1: Reference methods.
- International Organization for Standardization .(2011). ISO/DIS 6647-2, Rice—Determination of amylose content—Part 2: Routine methods.
- Jimenez, R. R., Anacleto, R., Resurreccion, A. P. & Fitzgerald M. A. (2011). Issues of adopting the new amylose method. 3th International Rice quality Conference, Bangkok, Thailand
- Jimenez, R. R., Resurreccion, A. P. & Fitzgerald, M. A. (2010). Moving from apparent to actual amylose in rice. 28th International Rice Research Conference, Hanoi, Vietnam.
- Juliano, B. O. (1971). A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Science Today*, 16:334-360.
- Kumar, I. & Khush, G. S. (1986). Gene dosage effect of amylase content in rice endosperm. *Japanese Journal of Genetics*, 61: 559-568.
- Sasaki, T., Yasui, T. & Matsuki, J. (2000). Effect of amylose content on gelatinization retrogradation, and pasting properties from waxy and non waxy wheat and their F1 seeds. *Cereal Chemistry*, 77: 58–63.
- Ward, R. M., Gao, Q., Bruyn, H., Gilbert, R. G., and Fitzgerald, M. A. (2006). Improved methods for the structural analysis of the amylose-rich fraction of rice flour. *Biomacromolecules*, 7: 866-876.
- Witt, T., Doutch, J., Gilbert, E. P. & Gilbert, R. G. (2012). The relations between molecular, crystalline and lamellar structures of amylopectin. *Biomacromolecules*, 13: 4273-82.

لیست نشریه‌های موسسه‌ی تحقیقات برنج کشور

شماره‌ی نشریه	عنوان	نویسنده(گان)	سال	قیمت (تومان)
۱	روش‌های آزمایشگاهی اندازه‌گیری ویژگی‌های کیفی دانه‌ی برنج	فاطمه حبیبی	۱۳۹۲	۱۰۰۰
۲	کرم ساقه‌خوار نواری برنج (شناسایی، زیست‌شناسی، خسارت و کنترل)	فرزاد مجیدی	۱۳۹۲	۱۵۰۰
۳	بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج	مریم خشکدامن	۱۳۹۲	۱۰۰۰
۴	مراحل فنولوژی برنج	مجید نحوی و مهرزاد اله‌قلی‌پور	۱۳۹۳	۲۰۰۰
۵	خصوصیات برخی از ارقام محلی برنج در شرایط استان گیلان	مهرزاد اله‌قلی‌پور و محمدصالح محمدصالحی	۱۳۹۳	۱۵۰۰
۶	اصلاح روش اندازه‌گیری میزان آمیلوز در دانه‌ی برنج بر اساس روش ایزو ۶۶۴۷	فاطمه حبیبی، میترا یکتا، فردوس عادلی، مریم فروغی، لادن نوری، طاهره محسنی	۱۳۹۳	۱۵۰۰

علاقه‌مندان به خرید نشریه می‌توانند به آدرس موسسه‌ی تحقیقات برنج کشور مکاتبه نموده یا با مسئول کتابخانه‌ی موسسه تماس حاصل فرمایند. شماره‌ی تماس: تلفن: ۶۶۹۰۰۵۲-۰۱۳۱ داخلی ۲۲۳؛ دورنگار: ۶۶۹۰۰۵۱-۰۱۳۱