

بررسی اثر مهار کنندگی ویتامین های B₃، B₆ و مخمرهای اتولیز شده بر پایه ساکارومیسس سرویزیه بر تشکیل آکریلامید در شرایط آزمایشگاهی

پیمان قجریگی^۱، ابوالفضل کامکار^{۲*}، اشرف حاج حسینی^۳، علی میثاقی^۲

۱- عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ایران

۲- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران

۳- استادیار دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه زنجان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱)

چکیده

مطالعات اولیه سم شناسی نشان داده که آکریل آمید به عنوان یک عامل سرطان زا است و اصلی ترین راه ایجاد آن واکنش بین اسید آمینه آسپارژین و قند های طبیعی نظیر گلوکز می باشد. کاهش و مهار تشکیل آکریلامید در طول فرآوری مواد غذایی می تواند به ارتقای سلامت محصولات غذایی و به دنبال آن، به ایمنی غذای انسان کمک کند. هدف اصلی این مطالعه بررسی اثر مهار کنندگی مخمر اتولیز شده بر پایه ساکارومیسس سرویزیه و ویتامین های B₃ و B₆ بر تشکیل آکریل آمید در مدل شیمیایی می باشد. در این مطالعه تاثیر غلظت های مختلف ۰/۰۲۵، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی مول از ویتامین های B₃ و B₆ و مخمر اتولیز شده خوراکی بر پایه ساکارومیسس سرویزیه بر میزان کاهش تشکیل آکریل آمید مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان آکریل آمید با روش گروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی تعیین گردید. بر اساس نتایج، ویتامین های B₃، B₆ و مخمر اتولیز شده بطور موثری باعث کاهش میزان تشکیل آکریل آمید شدند و در بین آنها ویتامین B₃ با غلظت نیم میلی مول بیشترین اثر را داشت (p<0.05). براین اساس توانایی هر سه ماده در کاهش تشکیل آکریل آمید معلوم گردید.

کلید واژگان: آکریل آمید، ویتامین B₃، ویتامین B₆، مخمر اتولیز شده

۱- مقدمه

بر اساس تحقیقات، افزودن مخلوط فلاونوئیدها به برخی از فرآورده های غذایی با مکانیسم جلوگیری از تبدیل آکرولئین به آکرلیک اسید نیز سبب کاهش آکرلامید شده است [۱۵]. بسیاری از گیاهان مانند رزماری به طور گسترده غنی از فلاونوئیدها هستند که به عنوان آنتی اکسیدان مواد غذایی در سراسر جهان استفاده می شوند [۱۶].

بر اساس موارد مطروحه و بررسی های انجام شده، کاهش میزان آکرل آمید می تواند به عنوان هدفی از اهداف افزایش ایمنی غذایی در نظر گرفته شود. با کمی توجه به رژیم غذایی موجود در جامعه ایرانی و تغییراتی که در طی سالهای اخیر در آن صورت گرفته و مطابق با آن مصرف غذای آماده و سریع پخت یا به عبارتی فست فودها و غذاهای چرب سرخ کرده و تنقلاتی مانند چیپس افزایش پیدا کرده، می توان اهمیت این اقدامات را نیز بیشتر لمس کرد. این مطالعه با هدف بررسی و پیدا کردن روشی کاربردی برای کاهش میزان آکرل آمید در مواد غذایی از طریق بکار بردن مواد مغذی و مخمرهای مفید صورت گرفته و فرضیه مطروحه آن، وجود اثر مهار کنندگی قابل قبول، ولی متفاوت مخمر اتولایز شده خوراکی بر پایه ساکارومایسس سرورزیه، ویتامین B₃ و ویتامین B₆ بر میزان تشکیل آکرل آمید می باشد. بنابراین هدف اصلی این تحقیق بررسی اثر مهار کنندگی مخمرهای اتولایز شده خوراکی بر پایه ساکارومایسس سرویزیه و ویتامینهای B₃ و B₆ بر تشکیل آکرل آمید در مدل آزمایشگاهی می باشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد

آسپارژین و قند گلوکز منویدرات از شرکت Sigma (آمریکا)، پودر مخمر اتولایز شده خوراکی ساکارومایسس سرورزیه از شرکت Bio Springer (فرانسه)، ویتامینهای B₃ و B₆ از شرکت BSFA، مواد شیمیایی برای روش آنالیز GC/MS (حلال ها مورد استفاده از شرکت مواد شیمیایی BDH (انگلیس، Poole) گرفته شد. تمام مواد شیمیایی دیگر با بالاترین خلوص از Merck (آلمان) خریداری شد.

۲-۲- تجهیزات

هیتر Reacti-Therm III مدل ۱۸۸۴۰، ظرف واکنش دهنده از جنس تفلون و شیشه مجهز به همزن از شرکت

آکرل آمید از سوی سازمان بین المللی تحقیقات سرطان (IARC) جزو ترکیبات احتمالی سرطان زا برای انسان معرفی شده و به امکان بروز آسیب های عصبی در مواجهه با سطوح بالای آن اشاره گردیده است [۲۱]. در سال ۲۰۰۲، پژوهشگران دانشگاه استکهلم و مرجع ملی غذایی سوئد مدارکی را مبنی بر وجود مقادیر بالای آکرل آمید در غذاهای حرارت دیده غنی از کربوهیدرات منتشر کردند و کشورهایی مانند انگلستان، کانادا و ایالات متحده نیز تحقیقات کشور سوئد را تأیید کردند [۳ و ۴]. گرچه آکرل آمید احتمالاً در غذاهای با فرایند حرارتی بالا وجود دارد ولی با توجه به اینکه غلظت آکرل آمید در غذاها بطور قابل ملاحظه ای بیشتر از سایر مواد سرطان زای مشابه شناخته شده مانند هیدروکربنهای آروماتیک پلی سیکلیک و اتیل کاربامات میباشد اهمیت دارد. سازمانهای مسئول نظیر بهداشت جهانی، خواربار جهانی و سازمان غذا و داروی آمریکا نیز آکرلامید در غذا را بعنوان یک عامل نگران کننده مطرح کرده و در خصوص لزوم تحقیق بیشتر در رابطه با مکانیسم تشکیل و اثرات آن بر سلامتی تأکید نمودند و در ادامه سازمان کدکس بین الملل تدوین استاندارد های آکرل آمید را در دستور کار خود قرار داد [۵-۸]. آکرل آمید علاوه بر مواد غذایی، از طریق کشیدن سیگار، تماس پوستی، آب آشامیدنی یا فرآورده های حاوی آن نیز می تواند وارد بدن گردد [۹ و ۱۰]. از جمله منابع اصلی ورود این ماده شیمیایی به بدن انسان در حالت عام مواد غذایی می باشد [۱۱]. آکرلامید از محصولات واکنش میلارد است و برخی از ویتامین ها مانند پیریدوکسامین با مهار تشکیل ترکیبات نهایی محصولات آمادوری (AGEs) حاصل از فرایند گلیکته شدن مانع تشکیل آن میشوند [۱۲]. ویتامین های B₂، B₁₂، PL و B₅ نیز در حدود ۲۰٪ از تشکیل آکرلامید جلوگیری می کنند. به نظر می رسد که در بین ویتامین های گروه B کار آیی ویتامین های B₃ و B₆ (بدلیل پایداری ساختاری بیشتر)، در جلوگیری از تشکیل آکرلامید بیشتر باشد. فعالیت بازدارندگی نسبی تشکیل آکرلامید در حضور ویتامین های محلول در چربی نه تنها در حد مطلوب نبوده بلکه سبب افزایش مقدار آکرلامید هم شده است [۱۳]. برخی محققان فعالیت آنتی اکسیدانی را به عنوان یکی از عوامل جلوگیری از تشکیل آکرلامید معرفی کرده اند [۱۴]. از طرفی

تخلیظ شد. نمونه آماده تزریق تا زمان آنالیز در فریزر نگهداری شد. تعیین مقدار آکریلامید توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی Varian مدل ۳۸۰۰ مجهز به آشکارساز طیف جرمی Varian مدل ۱۲۰۰، شیکر افقی، سانتریفوژ یخچال دار سرعت بالا، چند برابر کننده خلاء SPE، ستون waters Qasis HLB SPE.

۲-۳- روشها

۲-۳-۱- شرایط GC

ستون: Elite -Wax ETR- 15m, 0.53 ID, 0.5 μm film، حجم تزریق: ۱ میکرولیتر در ۰/۵ دقیقه، دمای تزریق: ۲۶۰ درجه سانتی گراد، گاز حامل: هلیوم با فشار ثابت، سرعت خطی: ۶۲ cm/sec در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد، دمای آن: ۱۰۰ درجه برای مدت ۰/۵ دقیقه تا ۲۰۰ درجه سانتی گراد.

۲-۳-۲- آنالیز از طریق کروماتوگرافی گازی/

اسپکترومتری جرمی GC/MS

آکریلامید بر اساس روشهای تارکه^۱ و لئوری^۲ با انجام اصلاحات لازم اندازه گیری شد بطور خلاصه ۵/۶ گرم نمونه مطابق روش آماده سازی شد [۱۷ و ۱۸]، پس از افزودن ۵۰۰ نانو گرم بر گرم متاکریلامید به عنوان استاندارد داخلی، ۵ میلی لیتر هگزان و سپس به نسبت مساوی آب مقطر و استون نیتریل به آن اضافه شد و کاملاً مخلوط شد. آنگاه ۵ گرم مخلوط سولفات سدیم بدون آب و کلرید سدیم به آن افزوده، پس از سانتریفوژ شدن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه لایه استون نیتریلی به طور کامل جداسازی شد. سپس لایه استون نیتریلی جمع آوری شده، بر اساس روش تارکه برومید شد. برای این منظور از پتاسیم بروماید، اسید هیدرو برومیک و آب برم اشباع استفاده شد. محلول حاصله به مدت یک شب در یخچال ۴ °C قرار گرفت. سپس برم اضافی با افزودن مقدار لازم تیوسولفات سدیم ۰/۷ مولار (چند قطره) بی رنگ شده و پس از افزودن سولفات سدیم، محلول حاصله توسط ۶۵ میلی لیتر اتیل استات، طی دو مرحله استخراج شد. فاز آلی حاصله پس از آبیگری توسط مقدار کافی سولفات سدیم، ابتدا بوسیله دستگاه تبخیر کننده چرخشی^۳ تحت خلا تبخیر شد، سپس تحت گاز ازت تا حجم ۲۵۰ میکرولیتر

۲-۳-۳- سازماندهی آزمایش

مدل شیمیایی آزمون براساس روش گوکمن (۲۰۰۶) که در آن از غلظتهای یک به یک پیش سازهای اصلی استفاده شده بود، با تغییراتی در مقدار وزنی مواد پیش ساز و همچنین مواد مورد آزمون، البته با حفظ نسبت ۱ : ۱ مواد واکنش دهنده اصلی آسپارژین با وزن مولکولی ۱۵۰ گرم برمول و مقدار ۰/۳۷۵ گرم معادل ۲/۵ میلی مول و گلوکز با وزن مولکولی ۱۸۰ گرم بر مول به مقدار ۰/۴۵ گرم معادل ۲/۵ میلی مول سازماندهی گردید [۱۹] و در ادامه ۵ میلی لیتر آب دیونیزه بعنوان واسط واکنش به آنها اضافه گردید. آزمایش در داخل ظرف واکنش از جنس تلفون و شیشه و در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد و مدت ۱۰ دقیقه که توسط هیتر تامین می شد به انجام رسید.

در ادامه غلظت های ۰/۲۵ و ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی مول از مخمر خوراکی ساکارومایسس سرویزیه، ویتامینهای B₃ و B₆، هر یک به صورت جداگانه به ترکیب ۲/۵ میلی مول آسپارژین و ۲/۵ میلی مول گلوکز و ۵ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه گردید. عمل حرارت دهی در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد و به مدت ده دقیقه مطابق روش آزمون برای هر یک بصورت مستقل تکرار شد. بعد از انجام واکنش، نمونه های مورد آزمون بسرعت خنک و سپس مطابق روش مورد استفاده از نظر مقدار آکریلامید مورد آنالیز قرار گرفتند.

۲-۳-۴- روشهای آماری

پس از جمع آوری داده ها، یافته ها در قالب جداول آماری ارائه گردید. برای بررسی نرمال بودن توزیع متغیرهای مورد بررسی از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. برای مقایسه میانگین بین هر گروه با گروه کنترل از آزمون t استفاده شد. برای مقایسه میانگین بین گروهها از آزمون آنالیز واریانس و تست تکمیلی توکی شد. سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

1. Tareke
2. Lehotay
3. Evaporator rotary

جدول ۱ مقایسه متوسط آکریلامید تشکیل شده در نمونه ها به تفکیک میزان ویتامین B₃ افزوده شده با گروه کنترل

| نام گروه | میانگین / میکروگرم | انحراف معیار | درصد کاهش | P.Value |
|--|--------------------|--------------|-----------|---------|
| کنترل | ۱۹۵/۸۰ | ۱۴/۲۱۹ | - | - |
| ویتامین B ₃ (۰/۲۵ میلی مول) | ۱۶۷/۶۷ | ۶/۵۶۳ | ٪۱۴ | <۰/۰۱ |
| ویتامین B ₃ (۰/۲۵ میلی مول) | ۱۰۲/۸۳ | ۲۵/۳۴۱ | ٪۴۷ | <۰/۰۱ |
| ویتامین B ₃ (۰/۵ میلی مول) | ۵۱/۰۰ | ۱۲/۴۲۶ | ٪۷۴ | <۰/۰۱ |

۳ - نتایج و بحث

همانگونه که در جدول شماره یک مشخص گردیده است، در مقایسه غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۵ میلی مول ویتامین B₃ با گروه کنترل، در تمامی موارد شاهد کاهش میزان تشکیل آکریل امید در نمونه مورد آزمون نسبت به نمونه کنترل می باشیم. البته میزان این کاهش برای غلظت های مختلف متفاوت بوده است. به طوری که با استفاده از غلظت ۰/۲۵ میلی مول ویتامین B₃ شاهد کاهش ٪۱۴ تشکیل آکریل امید بودیم. با افزایش دوز مصرفی به ۰/۲۵ میلی مول این میزان کاهش به ٪۴۷ رسید. میزان کاهش تشکیل آکریل امید با رسیدن غلظت B₃ به ۰/۵ میلی مول، به ٪۷۴ رسید. در آزمون آماری اختلاف بین گروههای ویتامین B₃ در غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۵ میلی مول بطور کلی معنی دار بود و با تست تعاقبی توکی مشخص گردید که این اختلاف معنی دار بین دوزهای تمام مقادیر به کار رفته وجود دارد.

بر اساس اطلاعات مندرج در جدول شماره (۲)، در مقایسه غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۵ میلی مول ویتامین B₆، کاهش میزان تشکیل آکریل امید در تمامی نمونه های مورد آزمون نسبت به نمونه کنترل مشهود می باشد. البته میزان این

کاهش برای دوزهای مختلف بکارگیری شده متفاوت است. بطوری که با استفاده از غلظت ۰/۲۵ میلی مول ویتامین B₆ شاهد ٪۱۳ کاهش تشکیل آکریل امید بودیم. با افزایش دوز مصرفی به ۰/۲۵ میلی مول این میزان کاهش به ٪۳۵ افزایش پیدا کرد. میزان کاهش تشکیل آکریل امید با اضافه شدن دوز به ۰/۵ میلی مول به رقم ٪۶۸ رسید. براساس آزمون آماری اختلاف کلی بین دوزهای مختلف به کار رفته ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۵ میلی مول ویتامین B₆ معنی دار بود. همچنین براساس آزمون تعاقبی توکی اختلاف بین تمامی دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۵ میلی مول ویتامین B₆ با یکدیگر به تفکیک نیز معنی دار بود.

بر اساس اطلاعات جدول شماره (۳) در مقایسه غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۵ میلی مول مخمر اتولایز شده خوراکی با گروه کنترل در تمامی موارد شاهد کاهش میزان تشکیل آکریل امید در نمونه مورد آزمون نسبت به نمونه کنترل می باشیم. البته این میزان کاهش برای دوزهای مختلف متفاوت بوده است. به طوری که با استفاده از غلظت ۰/۲۵ مخمر اتولایز شده خوراکی شاهد ٪۱۲ کاهش در تشکیل آکریل امید بودیم. در صورتی که با افزایش میزان دوز مصرفی به ۰/۲۵ میلی مول این میزان کاهش به ٪۳۰ افزایش یافته است.

جدول ۲ مقایسه متوسط آکریلامید تشکیل شده در نمونه ها به تفکیک میزان ویتامین B₆ افزوده شده با گروه کنترل

| نام گروه | میانگین / میکروگرم | انحراف معیار | درصد کاهش | P.Value |
|--|--------------------|--------------|-----------|---------|
| کنترل | ۱۹۵/۸۲ | ۱۴/۲۱۹ | - | - |
| ویتامین B ₆ (۰/۲۵ میلی مول) | ۱۷۱/۰۰ | ۱۵/۴۹۲ | ٪۱۳ | <۰/۰۱ |
| ویتامین B ₆ (۰/۲۵ میلی مول) | ۱۲۷/۰۰ | ۷/۷۹۷ | ٪۳۵ | <۰/۰۱ |
| ویتامین B ₆ (۰/۵ میلی مول) | ۶۲/۰۰ | ۱۵/۵۰۵ | ٪۶۸ | <۰/۰۱ |

جدول ۳ مقایسه متوسط آکریلامید تشکیل شده در نمونه ها به تفکیک میزان مخمر اتولایز شده خوراکی افزوده شده با گروه کنترل

| نام گروه | میانگین/میکروگرم | انحراف معیار | درصد کاهش | P.Value |
|----------------------|------------------|--------------|-----------|---------|
| کنترل | ۱۹۵/۸۲ | ۱۴/۲۱۹ | - | - |
| مخمر (۰/۲۵ میلی مول) | ۱۷۱/۵ | ۹/۵۴۵ | ٪۱۲ | <۰/۰۱ |
| مخمر (۰/۲۵ میلی مول) | ۱۳۸/۰۰ | ۲۱/۲۳۲ | ٪۳۰ | <۰/۰۱ |
| مخمر (۰/۵ میلی مول) | ۱۱۰/۶۷ | ۱۳/۹۸۱ | ٪۴۳ | <۰/۰۱ |

اتولایز شده خوراکی مشاهده شد که هر سه ماده در دوز مورد نظر قادر به کاهش میزان آکريل امید می باشند. همانطور که در بالا اشاره شده تفاوت چندانی بین آنها وجود نداشته و میزان کاهش براساس جدول شماره ۴ به ترتیب ۱۴٪، ۱۳٪ و ۱۲٪ بود. همچنین در بررسی انجام شده در بین دوزهای یکسان ویتامین B₃ و ویتامین B₆ و مخمر باغلظت ۰/۲۵ میلی مول براساس آزمون آماری اختلاف کلی بین این دوزها معنی دار نمی باشد.

میزان کاهش با ارتقاء دوز بکار رفته به ۰/۵ میلی مول به ۴۳٪ کاهش تشکیل آکريل امید رسید. اختلاف کلی بین دوزهای مختلف به کار رفته ۰/۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی مول مخمر اتولایز شده خوراکی معنی دار بوده و براساس آزمون تعاقبی انجام شده این تفاوت بین دوز ۰/۲۵ با دوز ۰/۲۵ و ۰/۵ همگی اختلاف معنی داری را نشان می دهند. در مقایسه عددی متوسط آکريل امید تشکیل شده در نمونه های مورد آزمون با افزودن دوز یکسان از ویتامین B₃، ویتامین B₆ و مخمر

جدول ۴ مقایسه متوسط آکریلامید تشکیل شده در نمونه ها با افزودن ویتامینهای B₃، B₆ و مخمر اتولایز شده خوراکی (۰/۲۵ میلی

(مول)

| نام گروه | میانگین/میکروگرم | انحراف معیار | درصد کاهش |
|-------------------------|------------------|--------------|-----------|
| ویتامین B ₃ | ۱۶۷/۶۷ | ۶/۵۶۳ | ٪۱۴ |
| ویتامین B ₆ | ۱۷۱/۰۰ | ۱۵/۴۹۲ | ٪۱۳ |
| مخمر اتولایز شده خوراکی | ۱۷۱/۵۰ | ۹/۵۴۱ | ٪۱۲ |

P-Value=0.814

P-Value=0.86 (Between B₃ with B₆)P-Value=0.82 (Between B₃ with yeast)P-Value=0.99 (Between B₆ with yeast)

خوراکی اختلاف کلی معنی دار بود. همچنین طی آزمون تعاقبی انجام گرفته مشخص گردید که بین دوز یکسان ۰/۲۵ از ویتامین B₃ با ویتامین B₆ اختلاف معنی دار نبوده ولی اختلاف بین ویتامین B₃ و مخمر اتولایز شده خوراکی در دوز ۰/۲۵ کاملاً معنی دار بود. همچنین بر مبنای عدد به دست آمده طی آزمون تعاقبی توکی اختلاف بین دوزهای یکسان ۰/۲۵ مخمر اتولایز شده خوراکی و ویتامین B₆ معنی دار نبود.

در بیشترین حد دوز استفاده شده یعنی ۰/۵ میلی مول بین گروههای مختلف ویتامین B₃، ویتامین B₆ و مخمر اتولایز شده خوراکی شاهد افزایش میزان اختلاف به وجود آمده در گروه بودیم. در این دوز همانگونه که در جدول (۶) نشان داده شده است بیشترین میزان کاهش مربوط به دوز ۰/۵ میلی مول ویتامین B₃ بوده که تشکیل آکريل امید را ۷۴٪ نسبت به گروه کنترل کاهش داده است.

براساس آزمون تعاقبی انجام شده در بین گروهها اختلاف معنی داری بین کاربرد تفکیک شده دوزهای ویتامین B₃، B₆ و مخمر اتولایز شده خوراکی مشاهده نشد.

هنگام بکارگیری غلظت یکسان ۰/۲۵ میلی مول برای گروه های مختلف ویتامین B₃، ویتامین B₆ و مخمر اتولایز شده خوراکی با توجه به افزایش دوز مواد افزودنی مورد آزمون، شاهد بروز اختلاف بیشتری در نتایج حاصل (جدول ۵) یعنی توانایی کاهش میزان آکريل امید بودیم. همانگونه که مشاهده می شود ویتامین B₃ بیشترین میزان کاهش تشکیل آکريل امید را در این دوز با ۴۷٪ به خود اختصاص داده است بعد از آن ویتامین B₆ با ۳۵٪ قرار دارد. مخمر اتولایز شده خوراکی نیز کمترین میزان کاهش این گروه را داشته و در حد ۳۰٪ نسبت به نمونه کنترل از تشکیل آکريل امید جلوگیری کرد. براساس آزمون توصیفی انجام شده بین دوزهای با غلظت یکسان ۰/۲۵ میلی مول از ویتامین های B₃، B₆ و مخمر اتولایز شده

جدول ۵ مقایسه متوسط آکريلامید تشکیل شده در نمونه ها با افزودن ویتامینهای B₆، B₃ و مخمر اتولایز شده خوراکی (۰/۲۵ میلی

(مول)

| نام گروه | میانگین/میکروگرم | انحراف معیار | درصد کاهش |
|-------------------------|------------------|--------------|-----------|
| ویتامین B ₃ | ۱۰۲/۸۳ | ۲۵/۳۴۱ | ٪۴۷ |
| ویتامین B ₆ | ۱۲۷/۰۰ | ۷/۷۹۷ | ٪۳۵ |
| مخمر اتولایز شده خوراکی | ۱۳۸/۰۰ | ۲۱/۲۳۲ | ٪۳۰ |

P-Value = 0.021

P-value = 0.11 (Between B3 with b6)

P-value = 0.02 (Between B3 with yeast)

P-value = 0.60 (Between B6 with yeast)

جدول ۶ مقایسه متوسط آکريلامید تشکیل شده در نمونه ها با افزودن ویتامینهای B₆، B₃ و مخمر اتولایز شده خوراکی

(۰/۵ میلی مول)

| گروه | میانگین/میکروگرم | انحراف معیار | درصد کاهش |
|-------------------------|------------------|--------------|-----------|
| ویتامین B ₃ | ۵۱/۰۰ | ۱۲/۴۲۶ | ٪۷۴ |
| ویتامین B ₆ | ۶۲/۰۰ | ۱۵/۵۰۵ | ٪۶۸ |
| مخمر اتولایز شده خوراکی | ۱۱۰/۶۷ | ۱۳/۹۸۱ | ٪۴۳ |

P-Value < 0.01

P-value < 0.38 (Between B3 with B6)

P-value < 0.01 (Between B3 with yeast)

P-value < 0.01 (Between B6 with yeast)

ویتامین B₃ و ویتامین B₆ بر کاهش تشکیل آکريل امید بود. بر اساس اطلاعات موجود، هر فرآیندی که بتواند بر عوامل موثر در مکانیسم تولید آکريل امید بویژه واکنش مایلارد تاثیر بگذارد، می تواند منجر به کاهش تولید این ماده شیمیایی در مواد غذایی گردد. افراد زیادی که در زمینه کاهش میزان تشکیل آکريل امید مطالعه کرده اند بطور مستقیم یا غیر مستقیم به مسیرهای تاثیر گذار بر عوامل موثر بر تشکیل این ماده روی آورده اند. در این مطالعه تمرکز اقدامات انجام شده بر شیوه تکنولوژیکی که از سه بخش پیش تیمار، تغییرات در فرمولاسیون و بالاخره فرآیند و فرآوری تشکیل شده است بود. بر اساس همین تقسیم بندی اقدامات انجام شده ما در این مطالعه از نوع پیش تیمار شیمیایی بود. با توجه به اینکه این مطالعه جهت بررسی میزان اثر مهار کنندگی ویتامینهای B₃، B₆ و مخمر اتولایز شده خوراکی در مدل شیمیایی صورت گرفت. اقدام شیمیایی در این گروه، تحت عنوان تغییر در فرمولاسیون طبقه بندی گردید، که شامل افزودن ترکیباتی است که از واکنش تشکیل آکريل امید جلوگیری نموده و یا توان حذف آن را دارند.

بعد از آن ویتامین B₆ قرار دارد که با دوز اعلام شده کاهشی به میزان ٪۶۸ را در تشکیل آکريل امید نسبت به گروه کنترل موجب گردید. در آخرین رتبه نیز مخمر اتولایز شده خوراکی قرار دارد که از تشکیل آکريل امید به میزان ٪۴۳ میزان نمونه کنترل جلوگیری کرد. در رابطه با دوزهای یکسان ۰/۵ میلی مول ویتامین B₃، B₆ و مخمر اتولایز شده خوراکی بر اساس آزمون آماری انجام شده، نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف کلی در گروه بود. همچنین آزمون تعاقبی انجام شده در بین گروههای یکسان ۰/۵ میلی مول ویتامین B₃ و ویتامین B₆ حاکی از معنی دار نبودن اختلاف بین این دو ترکیب می باشد. مقایسه بین ویتامین B₃ و مخمر اتولایز شده خوراکی نیز با دوز ذکر شده بیان کننده تفاوت معنی دار بین این دو گروه است. بر اساس مقادیر عددی به دست آمده برای دو گروه ویتامین B₆ و مخمر اتولایز شده خوراکی در دوز مورد مطالعه، اختلاف بین این گروهها نیز معنی دار می باشد. همانگونه که در قسمت اهداف ذکر گردید، فرضیه مطرح در این مطالعه بروز اثر مهار کنندگی قابل قبول، ولی متفاوت مخمر اتولایز شده خوراکی بر پایه ساکارومایسس سرورزیه،

مناسب نبوده و قادر به کاهش مناسب میزان تشکیل آکریل آمید نمی باشد [۲۱].

وقتی غلظت مواد بکار رفته جهت آزمون در مدل شیمیایی به ۰/۲۵ میلی مول یعنی حدود ۱۰ برابر میزان قبلی افزایش پیدا کرد همانطور که در جدول شماره (۵) نیز مشخص گردیده است، شاهد کاهش بیشتر در میزان تشکیل آکریل آمید در هر سه گروه بودیم. بر طبق ارقام بدست آمده ویتامین B₃ با ۰/۴۷٪ کاهش بیشترین توانایی مهار کنندگی را در دوز ۰/۲۵ میلی مول نشان داد. البته در این دوز شاهد افزایش قدرت مهار کنندگی ویتامینهای B₆ و مخمر اتولایز شده خوراکی به ترتیب ۳۵٪ و ۳۰٪ نیز بودیم. بر اساس آزمون آماری انجام شده درصد کاهش تشکیل آکریل آمید در حضور مخمر اتولایز شده و ویتامین B₃ معنی دار بود. ولی این مقدار کاهش در مقایسه با ویتامین B₆ اختلاف معنی داری را نشان نداد.

مقدار گلوکز و اسپارژین بکار رفته در آزمون زنگ یک میلی مول بود، در حالی که مقادیر بکار رفته در این مطالعه ۲/۵ میلی مول برای هر یک از افزودنیهای فوق الذکر بود. میزان کاهش تشکیل آکریل آمید در حضور ویتامینهای B₃، B₆ در دو مطالعه متفاوت بود. به این معنی که در هر دو مطالعه شاهد کاهش میزان تشکیل آکریل آمید بودیم ولی میزان کاهش در این مطالعه کمتر از میزان آن در مطالعه آقای زنگ بود که به کاهش حدود ۷۰٪ در تشکیل آکریل آمید اشاره کرده بود. دلیل این اختلاف، شاید حضور مقادیر بیشتری از پیش سازهای اسپارژین و گلوکز در مطالعه ما باشد.

با افزایش دوز افزودنیها به ۱۰ برابر دوز قبلی ملاحظه می شود که قدرت مهار کنندگی آنها فقط به میزان ۳ برابر قبلی افزایش پیدا کرد. این واقعیت به خطی نبودن رابطه بین قدرت مهار کنندگی و غلظت افزودنی های مورد استفاده اشاره دارد. این واقعیت در مطالعات دیگر نشان داده شده است. ، بطور مثال در تحقیق انجام شده توسط کولک و همکاران که در رابطه با اثر نمک طعام بر کاهش آکریل آمید در سال ۲۰۰۶ به انجام رسید این عدم خطی بودن بطور واضح اشاره شده است. در این مطالعه در حضور یک درصد نمک، میزان تشکیل آکریل آمید تا ۴۰٪ کاهش یافت ولی با افزایش غلظت نمک به سطوح بالاتر میزان کاهش کمتر از حد مورد انتظار بود و زمانی که مقدار نمک به بیش از ۳/۵٪ می رسد میزان کاهش دوباره شروع به افزایش نمود که البته با این میزان نمک غذا بطور معمول

طی بررسی های انجام شده مقالات متعددی در رابطه با بررسی کاهش آکریل آمید تشکیل شده توسط مواد شیمیایی یا عصاره های گیاهی وجود دارد.

در خصوص تاثیر ویتامینها بر کاهش تشکیل آکریل آمید یافته ها بسیار محدود بوده و اغلب مقالات منتشر شده نیز تنها به نتایج یک تحقیق در دسترس که توسط آقای زنگ^۴ به انجام رسیده اشاره می نمایند [۲۰] ضمن اینکه هیچگونه مقاله مدونی در رابطه با کار روی اثر مخمر اتولایز شده خوراکی بر آکریل آمید در طی بررسی بدست نیامد. در کشور ما نیز مطالعات انجام شده در این رابطه به استثناء بعضی موارد انگشت شمار، جنبه مروری داشته و مطالعات کاربردی اندکی در این مورد صورت گرفته است.

همانطور که در جدول شماره ۱ بخش یافته ها آمده است هنگامی که در مدل شیمیایی تشکیل آکریل آمید ۰/۲۵ میلی مول از سه ماده مورد آزمون اضافه شد پس از طی فرآیند و تشکیل آکریل آمید شاهد کاهش میزان تشکیل این ماده در حد ۱۲٪ الی ۱۴٪ برای هر سه ماده افزودنی بودیم. بر اساس آزمونهای آماری نیز اختلاف بین این اعداد معنی دار نبود. همچنین میزان کاهش نیز در هیچکدام از گروههای افزودنی در حد قابل توجهی نبود. این نتایج با توجه به میزان دوز ماده اضافه شده نسبت به دوز بکار رفته در سایر مطالعاتی که در قالب اقدامات تغییر فرمولاسیون طبقه بندی می شوند قابل توجیه است. بطور مثال در مطالعه ای مشابه توسط امیل کولک^۵ که از غلظتهای مختلف نمک جهت کاهش میزان تشکیل آکریل آمید استفاده کرد کاهش میزان تشکیل آکریل آمید در غلظتهای مختلف با یکدیگر متفاوت بوده و اثر مهار کنندگی نمک در تشکیل آکریل آمید در این مطالعه خطی نبود [۲۱].

همچنین در مطالب منتشره توسط زنگ و همکاران در سال (۲۰۰۹) میزان دوز ویتامین بکار رفته برای بررسی کاهش تشکیل آکریل آمید با توجه به وزن مولکولی ویتامینهای B₃، B₆، مخمر اتولایز شده خوراکی (که به ترتیب برابر ۱۲۳ گرم، ۲۰۵/۶ گرم و ۱۴۹/۵ گرم برای هر مول می باشد) حدود ۱۰ برابر بیشتر برای ویتامین B₃ و ۵ برابر بیشتر برای ویتامین B₆ استفاده شده در این مطالعه بود. با وجود این بنظر می رسد برای اثر بخشی مواد بکار گرفته شده دوز ۰/۲۵ میلی مول

4.Zeng
5. Kolek

بر اساس یافته بدست آمده فرضیه مطروحه در این مطالعه در خصوص وجود اثر مهارکنندگی قابل قبول، ولی متفاوت مخمر اتولایز شده خوراکی بر پایه ساکارومایسس سرورزیه، ویتامین B₃ و ویتامین B₆ بر کاهش تشکیل آکریل امید مورد تایید قرار می گیرد.

۴- نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصله و آزمونهای آماری انجام شده اثر مهارکنندگی ویتامینهای B₃ و B₆ و مخمر اتولایز شده خوراکی بر پایه ساکارومایسس سرورزیه بر تشکیل آکریل امید مورد تایید قرار گرفت. این اثر مهارکنندگی در مدل شیمیایی واضح و برجسته بود. همچنین در این مطالعه دوز مناسب برای هرکدام از سه ماده استفاده شده نیز معین گردید. همانگونه که قبلا نیز بیان گردید، چالش اصلی فرارو در اینگونه مطالعات علاوه بر توانایی کاهش تشکیل آکریل امید، حفظ ویژگیهای مطلوبی ارگانولپتیکی و تغذیه ای غذا نظیر طعم، رنگ و بو می باشد که در اثر واکنش مایلارد در ماده غذایی بوجود می آید. واقعیتی که در بسیاری از آزمونهای انجام شده در مطالعات این حوزه بدست نیامده و به این علت امکان استفاده عملی از اینگونه مطالعات را منتفی ساخته است. اما بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، اگر مواد مورد آزمون در دوزهای اپتیمم بکار گرفته شوند باعث کاهش میزان آکریل امید تشکیل شده و مهار چشمگیر اثرات منفی این ماده شیمیایی میشوند.

بر این اساس پیشنهاد اصلی این مطالعه استفاده از این مواد جهت کاهش میزان تشکیل آکریل در مواد غذایی است که در فرآیند آنها واکنش مایلارد نقش مهمی را در تولید رنگ و بو و طعم دارد. بکارگیری این مواد علاوه به کمک به کاهش این ماده سمی باعث افزایش کیفیت تغذیه ای غذای سرو شده نیز خواهد شد.

۶- منابع

- [1] Swedish National Food Administration, Information about acrylamide in food. 2002.
- [2] IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Industrial Chemicals 1994, No. 60, IARC, Lyon, France.

قابل خوردن نبود. از طرفی این عدم خطی بودن اثر مهارکنندگی می تواند بیانگر وجود یک دوز مناسب از ماده افزودنی باشد که دارای اثر مهارکنندگی قابل قبولتری در مقایسه با سایر دوزها باشد که از مقایسه اثر مهارکنندگی دوز های متفاوت مواد مختلف بکار رفته بدست می آید. لازم بذکر است، بیشترین میزان تشکیل آکریل امید وقتی حاصل می گردد، که نسبت پیش سازهای اسپارژین و گلوکز یک به یک باشد. در صورتیکه قند های دیگری مثل ساکاروز یا فروکتوز در واکنش شرکت داشته باشد، این اصل متفاوت خواهد بود. بعبارت دیگر، ماتریکس غذایی در میزان آکریل امید تولید شده در غذا موثر می باشد.

همانگونه که قبلا نیز بیان گردید، وقتی مقدار دوز استفاده شده از ویتامینهای B₃, B₆ و مخمر اتولایز شده خوراکی با افزایش دو برابری از ۲۵٪ به ۵۰٪ میلی مول افزایش یافت، اثر مهارکنندگی هر سه ماده افزایش یافت. ولی درصد کاهش تشکیل با میزان غلظت افزودنی های مورد استفاده رابطه خطی نداشت. ضمن اینکه در مخمر اتولایز شده نیز افزایش تنها به میزان ۵۰٪ میزان قبلی بوده است. با توجه به اینکه در رابطه با تاثیر مخمر خوراکی بر میزان تشکیل آکریل امید تا کنون مطالعه ای صورت نگرفته، بنظر می رسد در مجموع وجود اسیدهای آمینه مختلف در مخمر همراه با ترکیبات دیگری نظیر ویتامینهای موجود در آن باعث بروز اثر مهارکنندگی و تحریک کنندگی آنها روی میزان تشکیل آکریل امید باشد. اثری که حاصل تاثیر مواد مهار کننده و تشدید کننده تشکیل آکریل امید می باشد.

میزان تاثیر ویتامین B₃ در دوز نیم میلی مول طی این مطالعه با مطالعه آقای زنگ مطابقت دارد. البته میزان تاثیر ویتامین B₆ کمتر از مقادیر بدست آمده طی مطالعه آقای زنگ بود که با توجه به تفاوت مقادیر پیش ساز بکار رفته در دو آزمون قابل تفسیر است. این کارایی در مقایسه با نتایج بدست آمده از مطالعه سایر محققین که در آنها از سایر ویتامین ها و اسید های آمینه استفاده کردند بهتر بود و تنها با اسید آمینه سیستمین قابل رقابت بود [۲۱]. در مقایسه مقادیر بدست آمده برای دوز های مختلف مواد بکار رفته به تفکیک که در جداول مربوطه منعکس شده است در تمام گروهها دوز ۵۰ میلی مول بیشترین اثر مهارکنندگی را داشته است که این مسئله می تواند بیانگر دوز مناسب و موثر در کاهش آکریل امید باشد.

- acrylamide formation by vitamins in model reactions and fried potato strips. *Journal of Food Chemistry*, 116: 34-39.
- [14] 12. Zhang, Y., Bao, BL., Lu, BY., Ren, YP., Tie, XW., Zhang, Y. 2005. Determination of flavone C-glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1065:177-85.
- [15] 13. Fernández, S., Kurppa, L., Hyvönen, L. 2003. Content of acrylamide decreased in potato chips with addition of a proprietary flavonoid spice mix (Flavomare®) in frying. *Innovation Food Technology*, 17:24-26.
- [16] 15. Stadler, RH., Robert, F., Riediker, P., Varga, N., Davidek, T., Devaud, SP. 2004. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52(17); 5550-58.
- [17] Calle, B. D. I., Ole, O., Thomas, W., Elke, Anklam. 2003. Acrylamide in food products. Jointly organized by the European Commission's Directorates General Joint Research Centre (JRC) & Health and Consumer Protection (SANCO) and the Swedish National Food Administration Oud-Turnhout, Belgium, 28-29 April .
- [18] Claeys, W., De Vleeschouwe, K., Hendrickx, M. 2005. Effect of amino acids on acrylamide formation and elimination kinetics. *Biotechnology Progress*, 21, 1525–1530.
- [19] Gokmen, V., Senyuva, H.Z. 2006. A simplified approach for the kinetic characterization of acrylamide formation in fructose–asparagine model system. *Food Additives and Contaminants*, 23, 348–354.
- [20] Zeng, X., Cheng, K. W., Jiang, Y., Lin, Z. X., Shi, J. J., Ou, S. 2009. Inhibition of acrylamide formation by vitamins in model reactions and fried potato strips. *Journal of Food Chemistry*, 116, 34-39.
- [21] Yaylayan, V.A., Locas, C.P. Wnorowski, A., O'Brien, J. 2004. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *Agriculture and Food Chemistry*, 52, 5559-5563.
- [3] UK Food Standards Agency, Food survey information sheet, 2008. <http://www.foodstandards.gov.uk/foodsurvey/acrylamide>.
- [4] USDA., Agricultural Statistics. 2002. United states department of agriculture. www.usda.gov/contaminants/chemicalcontaminant/acrylamide.
- [5] Hogervorst, JG., Schouten, LJ., Konings, EJ., Goldbohm, RA., Van den Brandt, PA. 2008. Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell and prostate cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 1428-1438.
- [6] Health Implications of Acrylamide in Food Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002 .
- [7] Mucci, LA., Adami, H. 2005 .The role of epidemiology in understanding the relationship between dietary acrylamide and cancer risk in humans. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*, 3, 39-47.
- [8] Mucci, LA., Sandin, S., Balter, K., Adami, H-O., Magnusson, C., Weiderpass, E. ,2005. Acrylamide intake and breast cancer risk in Swedish women. *American Medicine Association*, 293, 1326–1327.
- [9] FAO/WHO Expert committee on Food Additives. summary and conclusions of sixty-fourth meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO, Rome, Italy, 2005, 1-47.
- [10] U.S. Environmental Protection Agency. 1993. Integrated Risk Information System, Acrylamide (CASRN 79-06-1), Office of Pollution Prevention and Toxics, available at <http://www.epa.gov/NCEA/iris/subst/0286.htm>
- [11] Elmore, J. S., Koutsidis, G., Dodson, A. T., Mottram, D. S., Wedzicha, B. L. 2005. Measurement of acrylamide and its precursors in potato, wheat, and rye model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1286–1293.
- [12] 9. Khalifah, RG., Baynes, JW., Hudson, BG. 1999. Amadorins: Novel post Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochemistry Biophysics Research Communication*, 257(2): 251-58.
- [13] 10. Zeng, X., Cheng, KW., Jiang, Y., Lin, ZX., Shi, JJ., Ou, SY. 2009. Inhibition of

In vitro evaluation of inhibitory role of Vitamins B₃ and B₆ and the autolysed yeast of *Saccharomyces cerevisiae* on acrylamide formation

Qagharbeigi, P.¹, kamkar, A.^{2*}, Haj Hosseini Babaei, A.³, Misaghi, A.²

1. Department of Health and Food Safety, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

2. Department of food hygiene, Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, IRAN.

3. Department of Chemical Engineering, Zanzan University, Qazvin, Iran

(Received: 92/7/7 Accepted: 94/4/1)

Earlier toxicological studies demonstrated that acrylamide is carcinogenic and most acrylamide in food is formed when asparagine amino acid reacts with certain naturally occurring sugars such as glucose. Inhibition, even reduction, of acrylamide formation during processing of foods, can help to produce more healthy food and, consequently, promote food safety. The objective of this study was to investigate the effects of the autolysed yeast of *Saccharomyces cerevisiae*, vitamins niacin (B₃) and pyridoxine (B₆) on acrylamide formation in chemical model.

In this study the effects of different concentrations (0.025, 0.25 and 0.5 mmol) of autolysed yeast of *Saccharomyces cerevisiae*, vitamins B₃ and B₆ on acrylamide formation were evaluated in a chemical model. The acrylamide level was determined by Gas chromatography- mass spectrometry (GC/MS).

According to the results vitamins B₃, B₆ and autolysed yeast of *Saccharomyces cerevisiae*, could reduce effectively acrylamide formation and vitamin B₃ at concentration of 0.5 mmol was the most effective (p<0.05).

This study indicated that these three additives could significantly reduce the acrylamide formation.

Key words: Acrylamide, Vitamin B₃, Vitamin B₆, Autolysed yeast.

*Corresponding Author E-Mail Address: akamkar@ut.ac.ir