



مطالعه اثر آنزیم آسپاراژیناز و برشتگی نان تافتون بر روی آکريل آميد

معصومه بارانی^{۱*}، محمد شاهدهی باغ خندان^۲

۱- کارشناسی ارشد مهندسی صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده ی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- عضو بازنشسته هیئت علمی دانشگاه صنعتی اصفهان، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده ی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۶	
کلمات کلیدی:	
آکريل آميد،	
آنزيم آسپاراژيناز،	
برشتگی،	
نان تافتون،	
واکنش ميلارد	
DOI: 10.22034/FSCT.19.126.361	
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.23.4	
* مسئول مکاتبات:	
Masoomebarani52@gmail.com	

با توجه به هرم تغذیه‌ای، غلات از گذشته یکی از مواد پایه اصلی و سهم اول را در رژیم غذایی افراد به خود اختصاص داده است. زمانی که مواد غذایی دارای کربوهیدرات، در معرض حرارت قرار بگیرند، در اثر ایجاد واکنش میلارد، آکريل آميد توليد می‌شود. میزان آکريل آميد در محصولات همچون غلات، محصولات آردی، انواع قهوه ها، سبب زمینی و محصولات خشک شده، قابل توجه می‌باشد. از آن جایی که نان تافتون یکی از محصولات آردی پرمصرف در کشور می‌باشد، در این تحقیق اثر آنزيم آسپاراژيناز و برشتگی نان تافتون بر روی آکريل آميد بررسی شده است. برای این منظور میزان آکريل آميد در سه حالت بدون برشتگی، برشتگی سطح یک و برشتگی سطح دو و همچنین آنزيم آسپاراژيناز در دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm در نان تافتون مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تاثیر این تیمارها بر بافت و رنگ نان نیز مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده، با افزایش میزان برشتگی، مقدار آکريل آميد نیز در نان افزایش می‌یابد. همچنین افزایش میزان برشتگی منجر به تیرگی رنگ نان و افزایش مقاومت به برش می‌شود. با استفاده از آنزيم آسپاراژيناز با غلظت ۵۰۰ ppm، در بالاترین سطح برشتگی محتوای آکريل آميد تا ۸۶ درصد نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. مصرف آنزيم آسپاراژيناز در محدوده این مطالعه تاثیر معنی‌داری بر بافت و رنگ نان نداشت. در پایان کار نیز نمونه‌های نان جهت ارزیابی حسی در دسترس داوران قرار گرفت. آنچه از نتیجه این ارزیابی به دست آمد حاکی از آن بود که در خواص حسی نان بهینه شده با آنزيم آسپاراژيناز و نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. و آنزيم آسپاراژيناز با حفظ خواص حسی مطلوب مصرف‌کننده موجب کاهش چشمگیر محتوای آکريل آميد شد.

۱- مقدمه

در همه ادوار غلات به ویژه نان‌ها، از جایگاه مهمی در رژیم غذایی افراد برخوردار بوده است. با توجه به این موضوع، حفظ سلامت این محصول اهمیت بسزایی دارد. کربوهیدرات و اسیدهای آمینه موجود در غلات در حضور حرارت متجر به تغییراتی در ساختار غلات می‌شوند. از جمله این تغییرات بروز واکنش میلارد است. میلارد یک واکنش شیمیایی بین قندهای احیا کننده و اسید آمینه است که منجر به تغییرات رنگ، عطر و طعم در محصول می‌گردد. علی‌رغم این که این واکنش باعث ایجاد بافت، رنگ و طعم مطلوب در نان می‌شود، ولی منجر به تولید مواد سرطان‌زا نیز می‌شود [۱]. آکریل آمید در مواد غذایی با روش‌های مختلفی تولید می‌شود. از جمله مهمترین این روش‌ها، واکنش میلارد است. این واکنش در دماهای بالاتر از ۱۲۰ درجه سانتیگراد بین اسیدهای آمینه و به ویژه اسید آمینه آسپاراژین و قندهای احیا کننده، ایجاد می‌شود [۲]. آکریل آمید در شکل پلیمری خود مشکل ساز نیست و در صنایع شیمیایی مختلف کاربرد دارد. زمانی که صحبت از سمیت آکریل آمید می‌شود مونومر آن مدنظر است [۳]. با توجه به وزن مولکولی پایین و قطبی بودن آکریل آمید پس از ورود به بدن حیوانات و انسان به سرعت توزیع می‌شود. این احتمال وجود دارد که برهمکنش آکریل‌آمید با ماتریس غذایی نظیر پروتئین روی جذب آن تاثیر بگذارد [۴]. دانشمندان به مقادیر بالای آکریل آمید در مواد غذایی پرنشاسته مانند نانوسبزی‌مینی و کم بودن مقدار آن در مواد غذایی پروتئینی مانند گوشت پی برده‌اند. آکریل آمید ترکیبی بالقوه سرطان‌زاست که در بدن تجزیه می‌شود و متابولیتی به نام گلاسید آمید تولید می‌کند. دریافت آکریل آمید در غلظت‌های بالا منجر به بروز اختلالات عصبی می‌شود. همچنین ایجاد سرطان توسط آکریل آمید در موش‌ها و جانوران چونده تایید شده است. بنابراین با توجه به سرطان‌زا و مخاطره آمیز بودن آکریل آمید حتی در مقادیر کم، پید کردن راه‌هایی برای کاهش تولید و یا به دام انداختن این ترکیب ضروری است. راهکارهای مختلفی برای کاهش تولید آکریل آمید حین پخت یا سرخ کردن مواد غذایی نشاسته ای وجود دارد. از آن جمله می‌توان به کاهش pH، کنترل دما و زمان حرارت دهی، کنترل میزان برشته‌گی، کنترل رطوبت و افزایش فعالیت آبی، افزودن یون‌های چند ظرفیتی، استفاده از آنتی اکسیدان و استفاده از آنزیم آسپاراژیناز اشاره کرد. استفاده از

آنزیم آسپاراژیناز به سبب هدف قرار دادن عامل اصلی تشکیل آکریل آمید یعنی همان اسید آمینه آسپاراژین و خارج کردن آن از واکنش روشی کارآمد برای کاهش تولید آکریل آمید می‌باشد. آنزیم آسپاراژیناز به عنوان کاتالیزور هیدرولیز آسپاراژین به آسپارتیک اسید و آمونیاک عمل می‌کند. زیزاک و همکاران تاثیر تیمار آسپاراژیناز را بر پوره سیب زمینی که در میکروویو پخته بود ارزیابی کردند. نتایج حاکی از آن بود که استفاده از آسپاراژیناز میزان آسپاراژینرا تا ۸۸ درصد و میزان آکریل آمید را تا ۹۹ درصد نسبت به روش بدون آنزیم کاهش می‌دهد [۵]. پارکر و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان کردند استفاده از تکنیک آنزیمی برای کاهش تولید آکریل آمید با حفظ ویژگی‌های حسی موثر می‌باشد، زیرا آسپاراژین تاثیر چندانی در تشکیل رنگ و طعم محصول ندارد [۶]. پدرشی و همکاران نشان دادند دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم آسپاراژیناز به ترتیب ۶۰ درجه سانتیگراد و ۷ می‌باشد. در این مطالعه کاهش ۶۷ درصدی محتوای آکریل آمید تولید شده در سیب زمینی سرخ شده تحت اثر تیمار آسپاراژیناز و دمای کنترل شده نسبت به روش معمول رویت شد [۷]. هندریکسن و همکاران نشان دادند برای افزایش عملکرد آسپاراژیناز بهتر است در مقادیر مختلف آنزیم آسپاراژیناز در خمیر بیسکویت نیمه شیرین، خمیر را پیش از پخت مدتی در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به حال استراحت گذاشته شود. سپس پخت در دمای ۲۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵/۵ دقیقه انجام شود [۸]. کوکوراوا نشان داد زمانی که ۲۱۵ میلی گرم آنزیم آسپاراژیناز در هر کیلوگرم آرد برای تولید رول نان‌های سرخ شده استفاده شود و نان‌ها در دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۸ دقیقه سرخ شوند کاهش ۹۶ درصدی اسید آمینه آسپاراژین رویت می‌شود. و مقدار کاهش آکریل آمید در حدی است که توسط دکتور قابل اندازه گیری و تشخیص نیست [۹]. هندریکسن و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر تیمار آسپاراژیناز را بر غلات و قهوه بررسی کردند آنچه از نتیجه این مطالعه به دست آمد شامل کاهش آکریل آمید در سطوح ۹۰ درصد در چپس تورتیلا و ۸۰-۷۰ درصد کاهش برای قهوه بود [۱۰]. واحدی و همکاران نیز بیان کردند با کاهش آسپاراژین آزاد در خمیر توسط آنزیم آسپاراژیناز میزان آکریل آمید به مقادیر بسیار کم کاهش داده شد [۱۱]. تاثیر میزان برشته‌گی بر محتوای آکریل آمید بررسی شد. نتایج حاصل نشان دادند که در نان‌هاییکه برشته نشده‌اند و یا زمانیکه در

استات/هگزان merck، سولفات سدیم merck و محلول‌های استاندارد آکریل آمید در غلظت‌های ۱، ۵، ۲۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی با دتکتور ECD تهیه شده است.

۲-۲ روش‌ها

۲-۲-۱ تهیه نان تافتون

برای تهیه هر نمونه، ۱۰۰ گرم آرد با ۶۰ الی ۶۵ سی سی آب ولرم با دمای ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتیگراد، یک گرم نمک، یک و نیم گرم مخمر خشک مخلوط شد. لازم به ذکر است پیش از تهیه خمیر، مواد پودری در آب حل شده سپس آرد به سایر اجزا اضافه شد. این فرمولاسیون معمولی برای تولید نان‌هاست. در نمونه‌های مورد مطالعه آنزیم اسپاراژیناز در غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm به ازای وزن آرد به فرمول افزوده شد. آنزیم به همراه سایر مواد پودری در آب حل می‌شود. دمای بهینه برای فعالیت آنزیم بین ۳۵ تا ۵۵ درجه می‌باشد. لذا دمای آب مصرفی برای حل کردن مواد پودری مشکلی در فعالیت آنزیم ایجاد نمی‌کند. سپس خمیرهای آماده به مدت یک ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انتقال یافت در نتیجه مرحله تخمیر انجام شد. پس از اتمام فرآیند تخمیر به مدت ۶۰ دقیقه و آماده شدن تیمارها مرحله پخت نان انجام شد. نانها با سه سطح برشته‌گی متفاوت تهیه شد. برشته‌گی سطح اول که دارای کمترین سطح برشته‌گی است به مدت ۶۰ ثانیه حرارت دید. برشته‌گی سطح دوم که برشته‌گی بیشتری نسبت به سطح اول قبل دارد، به مدت ۹۰ ثانیه حرارت دید. نمونه‌های با برشته‌گی زیاد به مدت ۱۲۰ ثانیه حرارت دهی شد. پس از آماده شدن نان‌های تازه، برای انجام آنالیز بافت و رنگ به آزمایشگاه انتقالی افت. در نهایت نمونه‌هایی که به منظور آنالیز آکریل آمید تهیه شده بود در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد خشک شد.

۲-۲-۲ آنالیز بافت با تست پانکچر

برای ارزیابی بافت نان از تست پانکچر استفاده شده است. تست پانکچر به منظور تعیین سفتی یا بیاتی نان مورد استفاده قرار می‌گیرد. لذا با استفاده از این تست تاثیر افزودن آنزیم اسپاراژیناز بر بافت نان بررسی شده است. این آزمون با استفاده از اینستران ۱۱۴۰ و پروبی به قطر ۰/۵ سانتیمتر انجام شده است. با جایگذاری مقادیر ارائه شده توسط دستگاه، در فرمول (۱) بافت ارزیابی گردیده است [۲].

دمای ۱۴۰ درجه سانتیگراد برشته شده اند، آکریل آمید دیده نشد. اما در دمای ۱۶۰ درجه سانتیگراد آکریل آمید در نان آرد گندم که به مدت ۲۶ دقیقه برشته شد و همچنین در نان آرد چاودار پس از ۲۲ دقیقه رویت شد [۱۲]. براتن و همکاران (۲۰۰۵) افزایش تیرگی رنگ نان‌های مسطح را در دما و زمان پخت طولانی بیان کردند. [۱۳]. ریدبرگ و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی میزان آکریل آمید تولید شده در سیب زمینی در بازه دمایی ۱۰۰ تا ۲۲۰ درجه سانتیگراد، نشان دادند. با افزایش دمای پخت (برشته‌گی) میزان آکریل آمید نیز افزایش یافته است [۱۴]. در این مطالعه تاثیر برشته‌گی، آنزیم اسپاراژیناز نان تافتون بر میزان آکریل آمید بررسی شده است. برای این منظور میزان آکریل آمید در سه حالت بدون برشته‌گی، برشته‌گی سطح یک و برشته‌گی سطح دو و همچنین آنزیم اسپاراژیناز در دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm در نان تافتون مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت شرایط بهینه برای تولید نان تافتون با استفاده از طرح RSM ارائه شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

در این تحقیق، برای تولید نان از نمک خوراکی، مخمر خشک نانوائی از شرکت فریمان (جهت حصول نتیجه بهتر، میزان مصرف خمیرمایه فریمان ۰۰۵ تا ۱۰۵ درصد وزن آرد مصرفی توصیه شده است، درجه حرارت مطلوب بین ۳۷ تا ۴۰ و pH بهینه بین ۴ تا ۶ می‌باشد)، آرد مخصوص لواش و تافتون کارخانه آرد اطلس استفاده شده است. برای کاهش آکریل آمید، آنزیم اسپاراژیناز شرکت نوزیم (Novozymes) به کار برده شده است. این آنزیم به طور خاص اسید آمینه اسپاراژین را حذف می‌کند، سایر اسیدهای آمینه و قندها جهت انجام میلارد، فعال باقی می‌مانند. این آنزیم به صورت میلی‌گرم در کیلوگرم آرد به فرمولاسیون اضافه می‌شود و باید ابتدا با آب حل شده و سپس اضافه گردد. دمای بهینه برای فعالیت آنزیم بین ۳۵ تا ۵۵ درجه و pH بهینه برای فعالیت آنزیم بین ۶ تا ۷ می‌باشد.

جهت استخراج آکریل آمید از نمونه‌ها، آب دیونیزه، محلول کارز ۱ و ۲، برومید پتاسیم merck، اسید هیدروبرومیک merck، تیوسولفات سدیم ۱ مولار merck، اتیل

$$F$$

$$S = \pi * t * D$$

در فرمول فوق پارامترهای زیر به کار برده شده است.
S: مقاومت نان در مقابل برش (shear strength) و سوراخ شدن نان است که هرچه بیشتر باشد به معنای سفت تر بودن بافت نان هست.

F: مقدار نیروی لازم برای سوراخ کردن نان

t: ضخامت نان

D: قطر پروب

۲-۳- رنگ‌سنجی به روش هانتربل

این آزمون به منظور بررسی تاثیر تیمارهای مختلف بر رنگ نان و با دستگاه رنگ سنج ZE6000 انجام شده است. برای ارزیابی رنگ نان‌ها در حضور آنزیم آسپاراژیناز و عدم حضور آن و میزان برشته‌گی‌های متفاوت، سیستم رنگ سنج هانتربل مورد استفاده قرار گرفته است. در این سیستم، رنگ بر مبنای سه پارامتر L: میزان روشنی با مقداری بین صفر تا صد، a: میزان سبز و قرمزی نمونه با مقدار مثبت و منفی و b: میزان آبی و زرد بودن نمونه با مقدار مثبت و منفی ارزیابی شده است. دستگاه از سه فیلتر و سه فتوسل که به یک گالوانومتر بسیار حساس متصل است، تشکیل شده است. برای اندازه گیری رنگ نمونه قسمتی از نمونه را روی مسیر تابش نور دستگاه قرار داده و مقادیر L، a و b نور انعکاس یافته از جسم بر روی دستگاه نمایش داده می‌شود [۲]. جهت بررسی اختلاف بین نمونه‌ها و نمونه شاهد از فرمول (۲) استفاده شده است.

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_c)^2 + (a - a_c)^2 + (b - b_c)^2}$$

در فرمول فوق پارامترهای زیر به کار برده شده است.

L: شاخص بعد سفیدی و سیاهی برای نمونه

L_c: شاخص بعد سفیدی و سیاهی برای نمونه شاهد

a: شاخص بعد قرمزی و سبزی برای نمونه

a_c: شاخص بعد قرمزی و سبزی برای نمونه شاهد

b: شاخص زردی و آبی برای نمونه

b_c: شاخص زردی و آبی برای نمونه شاهد

۲-۴- استخراج آکریل‌آمید

پانزده گرم پودر نمونه در لوله سانتریفوژ به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر ریخته شد و به آن ۱۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه شده، اضافه گردید. این نمونه به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شد. یک میلی‌لیتر اسید است

یک خالص به مخلوط اضافه گردید تا pH آن به ۴ تا ۵ برسد. به منظور رسوب پروتئینها به مخلوط آماده شده، ۲ میلی لیتر محلول کارز ۱ (۳۵/۸) گرم فری سیانید پتاسیم با سه ملکول آب تبلور به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد) و ۲ میلی لیتر محلول کارز ۲ (۲۲/۸) گرم سولفات روی با ۷ ملکول آب تبلور به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) اضافه گردید. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب ثقل ۱۶۰۰۰ سانتریفوژ شد و مایع رویی آن با عبور از پشم شیشه در بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری صاف گردید [۱۵].

حلالیت بالای آکریل‌آمید در آب باعث می‌شود هیچ حلال آلی نتواند آنرا از آب استخراج کند. از اینرو، برای کاهش قطبیت آن و افزایش تمایل آن برای استخراج با حلال آلی، مشتق سازی روی آن انجام می‌گیرد و آکریل‌آمید به ۲ و ۳ دی برومو پروپروپینامید تبدیل می‌شود. بدین منظور، ۷/۵ گرم برومید پتاسیم به محلول استخراج شده اضافه شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر اسید هیدروبرومیک به آن افزوده گردید تا pH آن به ۱ تا ۳ برسد. ضمن همزدن، ۱۰ میلی لیتر محلول آب برم اشباع، به آن اضافه گردید. درب ظرف با فویل آلومینیوم پوشانده و به مدت یک ساعت در حمام یخ قرار داده شد. پس از خروج از حمام یخ اجازه داده شد با محیط همدمما گردد. ضمن همزدن بالن، قطره قطره محلول تیوسولفات سدیم یک مولار برای خنثی سازی برم اضافی، به بالن اضافه شد تا رنگ محلول به حالت بیرنگ اولیه تبدیل شود [۱۵ و ۱۶].

محلول به دست آمده به قیف جدا کننده انتقال داده شد و ۵۰ میلی لیتر اتیل استات/هگزان (۴ اتیلاستات + ۱ هگزان) به آن اضافه گردید و یک دقیقه به آرامی همزده شد. محلول حدود ۱۰ دقیقه به حال سکون نگهداشته شد تا دو فاز شود. فاز رویی از میان ۱۵ گرم سولفات سدیم و پشم شیشه روی کاغذ صافی (به منظور آبگیری) عبور داده شد و به بالن ته گرد منتقل گردید. قیف و پشم شیشه دو مرتبه با مخلوطی از ۱۰ میلی لیتر اتیل استات/هگزان شستشو داده شد و به همان بالن منتقل گردید. ۲ و ۳ دی برومو پروپین امید با اتیل استات از آب استخراج شد. این ترکیب بسیار ناپایدار است و به ترکیب پایدار ۲ برومو پروپینامید تبدیل می‌شود. این واکنش در ستون‌های نیمه قطبی و قطبی کروماتوگرافی گازی خود به خود اتفاق می‌افتد. ولی در صورت استفاده از ستون‌های غیرقطبی باید قبل از تزریق نمونه به دستگاه، در دمای اتاق به

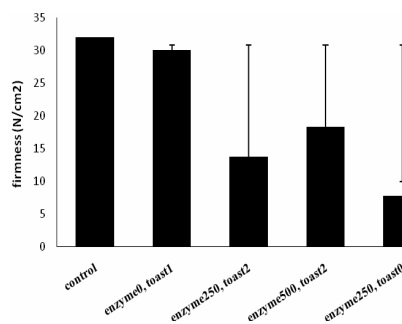
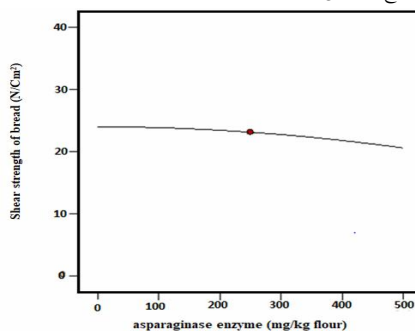


Fig 1 Interactive effects of asparaginase enzyme at different concentrations and degree of toasting on bread texture

۳-۱-۱- تاثیر آنزیم آسپاراژیناز بر بافت نان

آنالیز واریانس داده ها نشان داد که افزودن آنزیم آسپاراژیناز در مقدار های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم نسبت به آرد مورد استفاده بر مقاومت برشی نان اثر معنی داری نداشته است ($p > 0/05$). همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، افزودن مقادیر مختلف آنزیم آسپاراژیناز تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر تغییر مقاومت در مقابل برش نان ایجاد نمی‌کند. نقطه نشان داده شده در این شکل، حد وسط آنزیم مصرفی (۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم) را نشان می‌دهد. نتایج این قسمت مطابق با مرجع [۱۷] می‌باشد.



The point marked on the graph indicates the average concentration of consumed asparaginase enzyme (250 mg/kg flour)

Fig 2 Effect of different concentrations of asparaginase enzyme on shear strength of Taftoon bread

آن تریابتیل آمین اضافه نمود. سرانجام، بالن ته گرد به دستگاه تخییر درخلا وصل شد و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد روی آن تنظیم گردید تا محلول تغلیظ شود و حجم آن با گاز ازت به ۲ میلیلیتر رسانده شد [۱۶].

محلولهای استاندارد آکرلامید با غلظتهای ۱، ۵، ۲۰، ۷۵ و ۱۰۰ ppm آماده و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد. ستون ارزیابی آکریل امید ZBWAX با طول ۳۰ متری قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت ۱/۲۵ میکرومتری بود. حجم و دمای تزریق به ترتیب یک میکرولیتر و ۲۶۰ درجه سانتیگراد بودند. گاز حامل هلیوم و سرعت خطی جریان گاز شناساگر ۶۲ سانتیمتر بر ثانیه و نوع تزریق آن غیرانشعابی تنظیم گردید. پس از تزریق استانداردهای تهیه شده با غلظت های ذکر شده به دستگاه، منحنی کالیبراسیون بین سطح زیرمنحنی و غلظت آکریل امید (ppm) محلول های استاندارد رسم گردید. سپس میزان آکریل امید نمونه ها به کمک معادله خطی به دست آمده ($R^2=0.995$) براساس وزن خشک آن‌ها محاسبه شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ارزیابی بافت تافتون

آنچه از نتایج ارزیابی بافت و آنالیز واریانس نمونه‌ها به دست آمد بیانگر این مسئله بود که، تیمارهای آنزیم آسپاراژیناز و میزان برشنگی بر مقاومت برشی بافت نان، اثر معنی داری نداشته است. ($p > 0/05$). در شکل ۱ تاثیر تیمارهای مختلف بر مقاومت برشی نان تافتون مشاهده می‌شود. بیشترین مقاومت برشی در نمونه شاهد (با بیشترین برشنگی) وجود دارد. در تیماری که حاوی ۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم آنزیم آسپاراژیناز و در حالت بدون برشنگی، کمترین مقاومت رویت شد. با توجه به مطالعات پیشین می‌توان دریافت که تاثیر آنزیم آسپاراژیناز بر بافت معنی‌دار نیست و عامل تعیین کننده بر مقاومت برشی نان، میزان برشنگی آن می‌باشد [۱۷]. طبیعی است زمانی که نان در کمترین سطح برشنگی و حالت خمیری خود قرار دارد مقاومت کمتری نسبت به برش از خود نشان می‌دهد و رفته رفته با افزایش میزان برشنگی و سخت‌تر شدن بافت نان ای مقاومت افزایش می‌یابد.

می‌باشد. روشن‌ترین رنگ در تیمار حاوی ۲۵۰ میلی گرم در کیلو گرم آنزیم آسپاراژیناز در آرد و بدون برشته‌گی با ΔE حدود ۴۵ است. که این موضوع بیانگر تاثیر مهم برشته‌گی بر تیرگی رنگ نان می‌باشد که با افزایش برشته‌گی رنگ نان تیره می‌شود.

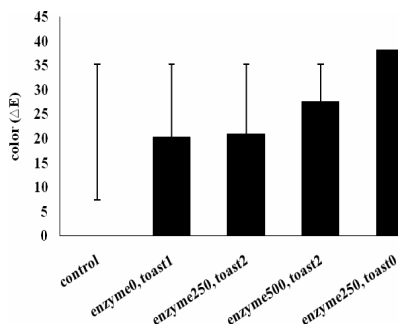


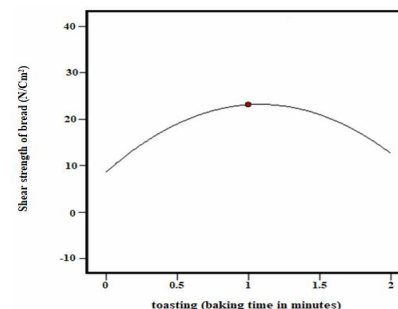
Fig 4 Interactive effects of asparaginase enzyme and degree of toasting on color of Taftoon bread (HunterLab system)

۳-۲-۱- اثر برشته‌گی بر رنگ

اندازه گیری رنگ نمونه ها با روش هانتربل انجام شد. نتایج ارزیابی نشان می دهد که شاخص L^* با افزایش برشته‌گی و تیره تر شدن رنگ نان کاهش می‌یابد. شاخص های a^* و b^* افزایش برشته‌گی و تیره تر شدن رنگ نان افزایش می‌یابند. به طوریکه با ثابت در نظر گرفتن میزان آنزیم، در برشته‌گی زیاد نسبت به نمونه بدون برشته‌گی، شاخص L^* ، ۲۵/۹ درصد کاهش، شاخص a^* ۳۹/۱۸ درصد افزایش و شاخص b^* ، ۲۱/۴۶ درصد افزایش یافته است. همچنین با افزایش برشته‌گی و تیره تر شدن رنگ نان شاخص ΔE کاهش می‌یابد. با افزایش سطح برشته‌گی نان، رنگ نمونه تیره تر می‌شود. آنچه از تجزیه واریانس داده ها به دست آمد بیانگر تاثیر معنا دار برشته‌گی بر رنگ نمونه ها می‌باشد ($p < 0/01$). براساس نتایج نشان داده شده در شکل ۵، افزایش زمان نگهداری نان در تنور پس از پخت کامل و افزایش برشته‌گی نان، منجر به کاهش ΔE و تیره تر شدن رنگ نان می‌شود. این موضوع تا حدی است که ΔE در نمونه بدون برشته‌گی حدود ۴۵ و در نمونه برشته حدود ۱۵ است. به عبارن دیگر بیانگر کاهش ۶۶/۶۶ درصدی ΔE با افزایش برشته‌گی می‌باشد. لازم به ذکر است که نتایج بدست

۳-۱-۲- تاثیر برشته‌گی بر بافت نان

آنالیز واریانس داده ها نشان داد میزان برشته‌گی در محدوده این آزمایش بر مقاومت بافت نان در برابر برش معنی دار نیست ($p > 0/05$). نتایج ارائه شده در شکل ۳ نشان می‌دهد که با افزایش زمان ماندگاری نان در تنور پس از پخت کامل تا ۱ دقیقه و رسیدن به برشته‌گی متوسط مقاومت برشی نان تافتون به علت سفتی بافت افزایش می‌یابد. اما با ادامه نگهداری نان در تنور تا بیش از یک دقیقه این مقاومت به علت شکننده شدن بافت نان در برشته‌گی زیاد روند کاهشی دارد. اما در مجموع این تغییرات اثر قابل توجهی بر مقاومت برشی را نسبت به نمونه شاهد ندارد. لازم به ذکر است که نقطه نشان داده شده در این شکل، بیانگر حد وسط برشته‌گی می‌باشد.



The point marked on the graph indicates the average degree of toasting

Fig 3 Effect of different degrees of toasting on shear strength of Taftoon bread

۳-۲-۲- نتایج ارزیابی رنگ تافتون

براساس آنالیز واریانس داده ها مشخص شد که اثر تیمار برشته‌گی بر رنگ نمونه معنی دار می‌باشد ($p < 0/01$). آنچه از آنالیز واریانس داده ها بر رنگ دست آمد نشان داد که آنزیم آسپاراژیناز در غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم بر رنگ نان معنی دار نیست ($p > 0/05$). آمرین و همکاران نیز نشان دادند که تیمار آسپاراژیناز در شیرینی زنجبیلی نسبت به نوع معمولی و بدون آسپاراژیناز به لحاظ طعم و رنگ یکسان هستند [۱۸]. هرچه میزان ΔE بیشتر باشد بیانگر روشن تر بودن رنگ و هرچه مقدار ΔE کمتر باشد بیانگر تیرگی رنگ نان می‌باشد. شکل ۴ تاثیر تیمارهای مختلف بر رنگ نان تافتون را نشان می‌دهد. تیره‌ترین رنگ در تیمار حاوی ۰ میلی گرم در کیلو گرم آنزیم آسپاراژیناز در آرد و برشته با ΔE حدود ۲۰

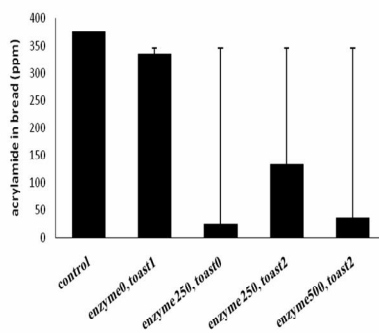


Fig 6 Interactive effects of asparaginase enzyme and degree of toasting on acrylamide content of Taftoon bread

۳-۳-۱- تاثیر آنزیم آسپاراژیناز بر آکریل آمید

افزودن آنزیم آسپاراژیناز به آرد، آکریل آمید نان تافتون را تا حد چشمگیری کاهش داد. با افزایش غلظت آنزیم آسپاراژیناز کاهش بیشتر آکریل آمید مشاهده می‌شود. به طوری که با افزودن ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم آرد، محتوای آکریل آمید نان تافتون تا بیش از ۸۵ درصد نسبت به تیمار شاهد با حفظ همان برشته‌گی کاهش می‌یابد. آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که تاثیر افزودن آنزیم آسپاراژیناز بر میزان آکریل آمید معنی‌دار بود ($p < 0.01$). همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، افزایش میزان آنزیم آسپاراژیناز، باعث کاهش محتوای آکریل آمید می‌شود. مکانیسم این کاهش از طریق تجزیه اسید آمینه آسپاراژین به عنوان عامل اصلی تشکیل آکریل آمید و تبدیل آن به آمونیاک و آسپارتیک اسید می‌باشد. اولین پژوهشی که آنزیم آسپاراژیناز با هدف کاهش آکریل آمید استفاده شد توسط Zyzak و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. در این پژوهش به پوره سبب زمینی آنزیم آسپاراژیناز افزوده گردید و پس از پخت در مایکروویو ۸۸ درصد کاهش در میزان آسپاراژین و کاهش ۹۹ درصد در محتوای آکریل آمید نسبت به روش معمولی مشاهده شد [۵]. همچنین Parker و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند استفاده از تکنیک آنزیمی برای کاهش تولید آکریل آمید با حفظ ویژگی‌های حسی موثر می‌باشد زیرا آسپاراژین تاثیر چندانی در تشکیل رنگ و طعم محصول ندارد [۶].

Hendriksen و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر تیمار آسپاراژیناز را بر غلات و قهوه بررسی کردند آنچه از نتیجه این مطالعه به

آمده منطبق با نتایج بیان شده در مراجع [۵ و ۱۹ و ۲۰] می‌باشد.

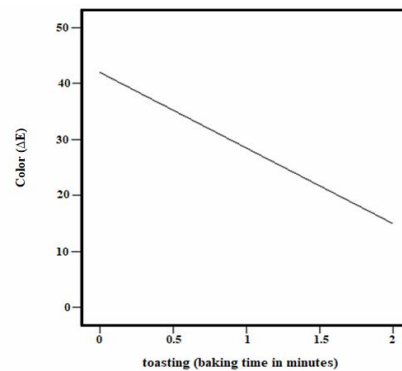


Fig 5 Effect of degree of toasting on color of Taftoon bread (HunterLab system)

۳-۳-۲- نتایج آنالیز آکریل آمید

آنچه از آنالیز واریانس داده‌ها به دست آمد بیانگر معنی‌دار بودن اثر آنزیم آسپاراژیناز و برشته‌گی بر میزان آکریل آمید در محدوده این آزمایش می‌باشد. حداکثر دوز مجاز توصیه شده، ۲ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن به صورت روزانه می‌باشد به طور مثال یک فرد با جرم ۷۰ کیلوگرم مجاز است کمتر از ۱۴۰ میکروگرم آکریل آمید در روز از طریق مواد غذایی دریافت کند [۲۱]. در شکل ۶ تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان آکریل آمید اراده شده است. بیشترین میزان آکریل آمید تولید شده در نمونه شاهد (بدون آنزیم آسپاراژیناز و بیشترین برشته‌گی) می‌باشد که حاوی بیش از ۳۸۰ میکروگرم بر کیلوگرم نان، آکریل آمید می‌باشد و کمترین میزان آکریل آمید تولید شده در نمونه حاوی ۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم آنزیم آسپاراژیناز در آرد و بدون برشته‌گی می‌باشد که حاوی حدود ۱۹ میکروگرم در کیلوگرم نان، آکریل آمید می‌باشد. از آنجایی که نان بدون برشته‌گی و خمیری چندان برای مصرف کننده مطلوب نیست، می‌توان با تولید نان تافتونی حاوی ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم آنزیم آسپاراژیناز در آرد، و با بیشترین میزان برشته‌گی به محتوای آکریل آمید حدود ۵۰ میکروگرم در کیلوگرم نان رسید. یعنی با افزودن آنزیم آسپاراژیناز با حفظ همان برشته‌گی نمونه شاهد می‌توان محتوای آکریل آمید را تا ۸۶ درصد کاهش داد.

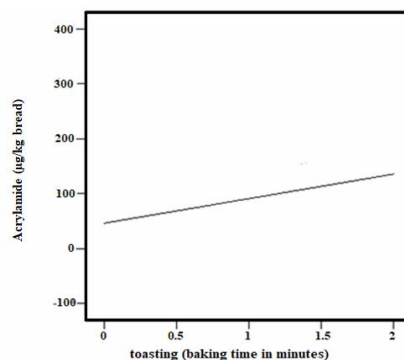


Fig 8 Effect of different amounts of asparaginase enzyme on the acrylamide content of Taftoon bread

۳-۴- نتایج ارزیابی حسی

ارزیابی حسی به منظور بررسی میزان بازاریابندی محصول در نمونه شاهد و نمونه بهینه صورت گرفت. نمونه های نان تافتون آماده شده و به مدت دو ساعت پس از پخت در دمای اتاق نگه داری شد. سپس نمونه ها به منظور ارزیابی بین ۱۲ داور انتخابی توزیع شد. محل داوران در طول آزمون حسی ثابت بود و زمان آزمون های حسی حدود ساعت ۱۱ صبح انتخاب شد. آزمون حسی مطابق روش هدونیک هفت نقطه ای (از بسیار نامطلوب تا بسیار مطلوب) انجام گرفت و صفات عطر و طعم، رنگ، بافت و پذیرش کلی نان توسط داوران مورد بررسی قرار گرفت. جهت شناسایی فرمولاسیون بهتر، به منظور خارج کردن واریانس حاصل از تفاوت داوران، هر داور به منزله یک بلوک در نظر گرفته شد و از آزمون فاکتوریل در طرح بلوک های کامل تصادفی استفاده گردید و نتایج حاصل توسط نرم افزار Mstac نسخه ۱۱٫۰۰ آنالیز گردید.

آنچه از نتیجه ارزیابی حسی حاصل شد، این بود که بین نمونه شاهد و نمونه بهینه تفاوت معنی داری به لحاظ ویژگی های ارگانولپتیکی محصول وجود ندارد. این مسئله نشان می دهد افزودن آنزیم آسپاراژیناز با وجود اثر کاهش که بر میزان تشکیل آکریل آمید در نان، باعث تغییر در ویژگی های ارگانولپتیکی نمی شود و بر مطلوبیت و بازار پسنندی نان اثر منفی ندارد. در پژوهشی دیگر Amrein و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که تیمار آسپاراژیناز در شیرینی زنجبیلی منجر به کاهش ۷۵ درصدی آسپاراژین آزاد و کاهش ۵۵ درصدی محتوای آکریل آمید می شود. همچنین بیان کردند این

دست آمد شامل کاهش آکریل آمید در سطوح ۹۰ درصد در پیس تورتیلا و ۸۰-۷۰ درصد کاهش برای قهوه بود [۱۰]. با توجه به نتایج این پژوهش و پژوهش های مشابه می توان به تاثیر مهم آنزیم آسپاراژیناز در کاهش اسید آمینه آسپاراژین و در نتیجه کاهش تشکیل آکریل آمید پی برد.

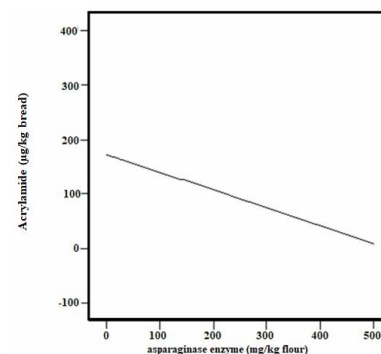


Fig 7 Effect of different concentrations of asparaginase enzyme on acrylamide content of Taftoon bread

۳-۳-۲- اثر برشته‌گی بر میزان آکریل آمید

با توجه به شکل ۸، افزایش میزان برشته‌گی نان، مقدار آکریل آمید را در نمونه ها افزایش می دهد. آنچه از آنالیز واریانس داده ها به دست آمد نشان داد که تاثیر برشته‌گی بر میزان آکریل آمید قابل توجه است ($P < 0/01$). افزایش برشته‌گی از طریق افزایش زمان ماندگاری نان در تنور ایجاد شد و طبق نتایج به دست آمده در تحقیقات پیشین افزایش زمان و دمای پخت منجر به افزایش تشکیل آکریل آمید می شود. مکانیسم این فرایند به تسهیل در دسترس قرار گرفتن واکنش دهنده ها (قندهای احیاکننده و آسپاراژین) در دمای بالا و فرصت انجام واکنش به صورت کامل در زمان طولانی نسبت داده شده است. در پژوهشی Przygodzka و همکاران تاثیر افزایش محتوای آکریل آمید در نان را با افزایش دما اثبات کردند [۱۲]. همچنین در پژوهش دیگری Rydberg و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی میزان آکریل آمید تولید شده در سیب زمینی در بازه دمایی ۱۰۰ تا ۲۲۰ درجه سانتیگراد، نشان دادند با افزایش دمای پخت (برشته‌گی) میزان آکریل آمید نیز افزایش یافته است [۱۴]. در نتایج مشابهی Claus و همکاران (۲۰۰۸) افزایش مقدار آکریل آمید را در نتیجه افزایش زمان و دمای پخت در نان گندم گزارش کردند [۴].

Journal of Cereal Science, 47(3), 546-554. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.06.011

- [5] David V. Zyzak, Robert A. Sanders, Marko Stojanovic, Daniel H. Tallmadge, B. Loye Eberhart, Deborah K. Ewald, David C. Gruber, Thomas R. Morsch, Melissa A. Strothers, George P. Rizzi, and Maria D. Villagran. 2003, Acrylamide formation mechanism in heated foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(16), 4782-4787. <https://doi.org/10.1021/jf034180i>.
- [6] Parker, Jane K., Dimitrios P. Balagiannis, Jeremy Higley, Gordon Smith, Bronislaw L. Wedzicha, and Donald S. Mottram, 2012, Kinetic model for the formation of acrylamide during the finish-frying of commercial French fries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(36) 9321-9331. <https://doi.org/10.1021/jf302415n>.
- [7] Pedreschi, Franco, Karl Kaack, and Kit Granby, 2008, The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries, Food chemistry, 109.2, 386-392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.057>
- [8] Hendriksen, Hanne V., Beate A. Kornbrust, Peter R. Østergaard, and Mary A. Stringer, 2009, Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*, Journal of agricultural and food chemistry, 57(10), 4168-4176. <https://doi.org/10.1021/jf900174q>
- [9] Kukuřová, Kristina, Francisco J. Morales, Alena Bednarikova, and Zuzana Ciesarova, 2009, Effect of l - asparaginase on acrylamide mitigation in a fried - dough pastry model, Molecular Nutrition & Food Research 53(12), 1532-1539. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800600>.
- [10] Hendriksen, H. V., G. Budolfson, and M. J. Baumann, 2013, Asparaginase for acrylamide mitigation in food.", Aspects of Applied Biology, 116, 41-50 .
- [11] Vahedi H, Azizi M, Kobarfard F, Barzegar M, Hamidi Esfahani Z, 2012, The effect of flour extraction rate, amount of asparaginase enzyme, and baking temperature and time on acrylamide formation in Sangak bread, Iranian J Nutr Sci Food Technol, 7 (3), 51-60. URL: <http://nsft.sbm.ac.ir/article-1-858-fa.html>.

شیرینی نسبت به نوع معمولی و بدون آسپاراژیناز به لحاظ طعم و رنگ یکسان هستند [۱۸].

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه اثر همزمان عوامل تاثیرگذار بر کاهش آکریل امید مانند تخمیر، کنترل مناسب میلارد با استفاده از کنترل محتوای آسپاراژین با آنزیم آسپاراژیناز، بررسی تاثیر سطوح مختلف برشته‌گی بر محتوای آکریل امید و کنترل دما و زمان پخت، بررسی شده است. از آن جایی که تولید ترکیب سرطانی‌زای آکریل امید حین پخت مواد غذایی نشاسته‌ای یکی از مشکلات موجود در فرآوری غلات می‌باشد، آنچه در نتیجه این تحقیق و تحقیقات پیشین به دست آمده این است که استفاده از آنزیم آسپاراژیناز از سایر روش‌ها کارآمد تر بوده و تا حدود زیادی محتوای آکریل امید را بدون تغییر طعم و رنگ کاهش می‌دهد. تولید نانی با برشته‌گی مطلوب مصرف کننده، با پایستری محتوای آکریل امید نسبت به نوع معمول، بدون تغییر در خواص ارگانولپتیکی، از نتایج این مقاله استخراج شده است. پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آتی، مطالعات وسیع‌تری بر روی تولید تجاری و وسیع این آنزیم انجام شود.

۵- منابع

- [1] Krishnakumar, T and Visvanathan, R, 2014, Acrylamide in food products: a review, *J. Food Process Tech*, 5(7). DOI: 10.4172/2157-7110.1000344.
- [2] Keramat, Javad, LeBail, Alain., Prost, Carole., & Jafari, Maryam, 2011, Acrylamide in baking products: a review article., Food and Bioprocess Technology, 4(4), 530-543. DOI: 10.1007/s11947-010-0495-1
- [3] Besaratinia, Ahmad. and Pfeifer, Gerd, 2007, A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity, *Carcinogenesis*, 28(3), 519-528, doi: 10.1093/carcin/bgm006. Epub 2007 Jan 18.
- [4] Claus, Achim., Mongili, Melani., Weisz, Georg M., Schieber Andreas., Carle, Reinhold, 2008, Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls,

- Analytica Chimica Acta, 584(2), 322-332. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.10.061>.
- [17] Ciesarová, Z. (2016). Impact of l-asparaginase on acrylamide content in fried potato and bakery products. *Acrylamide in Food [Internet]. Elsevier; [cited 2020 Mar 28]*, 405-421.
- [18] Amrein, Thomas M., Barbara Schönbacher, Felix Escher, and Renato Amadò, 2004, Acrylamide in gingerbread: critical factors for formation and possible ways for reduction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4282-4288. <https://doi.org/10.1021/jf049648b>
- [19] Friedman, Mendel, and Carol E. Levin, 2008, Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(15), 6113-6140. <https://doi.org/10.1021/jf0730486>.
- [20] Lukac, Helen, Thomas M. Amrein, Rainer Perren, Béatrice Conde - Petit, Renato Amadò, and Felix Escher, 2007, Influence of roasting conditions on the acrylamide content and the color of roasted almonds, *Journal of food science*, 72(1) C033-C038. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00206.x>.
- [21] Ghasemzadeh Mohamadi, Vahid, Atefi, Mohsen, Homayoonfar, Reza, Hejazi, Ehsan, Toode Roosta, Zahra, 2013, Investigation of acrylamide formation conditions and ways to reduce it in specific food sources, *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 7(5), 957-968. <http://nsft.sbm.ac.ir/article-1-1094-fa.html>.
- [12] Przygodzka, Małgorzata, Mariusz K. Piskula, Kristína Kukurová, Zuzana Ciesarová, Alena Bednarikova, and Henryk Zieliński, 2016, Factors influencing acrylamide formation in rye, wheat and spelt breads, *Journal of cereal science*, 65, 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.06.011>.
- [13] Bråthen, Erland, and Svein Halvor Knutsen, 2005, Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread, *Food Chemistry*, 92(4), 693-700. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.030>.
- [14] Rydberg, Per, Sune Eriksson, Eden Tareke, Patrik Karlsson, Lars Ehrenberg, and Margareta Törnqvist, 2003, Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(24), 7012-7018. <https://doi.org/10.1021/jf034649+>.
- [15] Pittet, Alain, Adrienne Périsset, and Jean-Marie Oberson, 2004, Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1035(1), 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.037>
- [16] Zhang, Yu, Yiping Ren, Hangmei Zhao, and Ying Zhang, 2007, Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using gas chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry,



A Study of the effect of asparaginase enzyme and toasting of taftoon bread on acrylamide

Barani, M. ^{1*}, Shahedi, M. ²

1. Masters of Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

2. Retired professor of Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received 2022/ 02/ 20
Accepted 2022/ 05/ 16

Keywords:

Acrylamide,
Asparaginase enzyme,
Toast,
Taftoon bread,
Millard reaction

DOI: 10.22034/FSCT.19.126.361

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.23.4

*Corresponding Author E-Mail:
Masomebarani52@gmail.com

According to the food pyramid, cereals have long been one of the main raw materials and the first group in the diet of people. Acrylamide is produced by the Millard reaction when carbohydrate foods are exposed to heat. The amount of acrylamide in products such as cereals, flour products, coffees, potatoes and dried products is significant. Since Taftoon bread is one of the most widely used flour products in the country, in this study, was investigated the effect of asparaginase enzyme and Taftoon bread toasting degree on acrylamide content. For this purpose, the amount of acrylamide was investigated in three cases without toasting, level one toasting and level two toasting, as well as asparaginase enzyme at two concentrations of 250 and 500 ppm in Taftoon bread. Also the effect of these treatments was investigated on the texture and color of bread. According to the results, with increasing of toasting degree, acrylamide content increases too. And increasing of toasting degree leads to darkening of the color bread and increasing shear strength. Use of asparaginase enzyme at a concentration of 500 ppm, at the highest toasting degree was able to reduce the acrylamide content by 86% compared to the control sample. In this study, asparaginase enzyme had no significant effect on texture and color of bread. In the final, samples of bread were made available to the judges for sensory evaluation. The results showed that the asparaginase enzyme did not change the sensory properties of bread despite the decrease in acrylamide content.