



## تاثیر آنزیم آلفا آمیلاز بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ساختاری نشاسته‌ی ذرت قبل و بعد از پیش

## تیماز فشار بالا

کیانا پورمحمدی<sup>۱\*</sup>، الهه عابدی<sup>۱</sup>

۱- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده ی کشاورزی، دانشگاه فسا.

## اطلاعات مقاله

## چکیده

## تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۳

## کلمات کلیدی:

نشاسته‌ی ذرت،

آلفا آمیلاز،

فرایند فشار بالا،

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی،

ساختار مورفولوژیکی.

فرایند فشار بالا فناوری غیر حرارتی جدیدی است که توسط آن، ماده‌ی غذایی در معرض فشاری برابر با ۱۰۰-۶۰۰ مگاپاسکال قرار می‌گیرد. در این پژوهش، تاثیر آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی بر درجه‌ی آبکافت، میزان بلورینگی، ویژگی‌های ساختاریو حرارتی نشاسته‌ی ذرت قبل و بعد از تیمار با فرایند فشار بالا (۳۰۰ و ۶۰۰ مگاپاسکال) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، با افزایش میزان فشار، تاثیر فرایند بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حرارتی نشاسته بیشتر شد. همچنین نشاسته‌های تیمار شده با فرایند فشار بالا نسبت به هیدرولیز آنزیمی حساس‌تر بودند، بطوریکه میزان هیدرولیز در نشاسته‌های تیمار شده با فشار ۶۰۰ مگاپاسکال ۳۱/۵۸٪ و در نشاسته‌های تیمار شده با فشار ۳۰۰ مگاپاسکال ۲۶/۱۲٪ بود. نتایج آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد نشاسته‌های تیمار شده با فشار معادل ۶۰۰ مگاپاسکال، دارای بیشترین تخلخل، فرورفتگی و ناهمواری در سطح گرانول‌های نشاسته بودند و بیشترین حساسیت را در برابر هیدرولیز آنزیمی از خود نشان دادند. میزان بلورینگی در نشاسته‌های تیمار شده با فشار بالا و آنزیم، بدلیل از بین رفتن ساختار کریستالی نشاسته، نسبت به نمونه‌ی نشاسته‌ی طبیعی کمتر بود. بطوریکه میزان بلورینگی از ۳۹/۴۵٪ در نشاسته‌ی طبیعی به ۲۸/۴۳٪ در نشاسته‌های تیمار شده با فشار ۶۰۰ مگاپاسکال کاهش یافت. نتایج حاصل از ویژگی‌های حرارتی نشاسته‌ها نشان داد با افزایش میزان فشار اعمال شده، پارامترهای  $T_o$ ،  $T_p$  و  $T_c$  و آنتالپی از ۱۵/۴ در نشاسته‌ی طبیعی به ۱۱/۴ در نشاسته‌ی تیمار شده با ۶۰۰ مگاپاسکال کاهش یافت و نمونه‌های تیمار شده با فشار بالا و هیدرولیز شده توسط آنزیم آلفا آمیلاز دارای کمترین دمای ژلاتینه شدن و آنتالپی بودند. فرایند فشار بالا می‌تواند باعث ایجاد اصلاحات فیزیکی مطلوبی بر نشاسته شود که به واسطه‌ی این اصلاحات، می‌توان جهت هیدرولیز نشاسته‌ها از میزان کمتری آنزیم آلفا آمیلاز استفاده نمود.

DOI: 10.22034/FSCT.19.128.293

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.28.3

\* مسئول مکاتبات:

kpourmohammadi@yahoo.com

## ۱- مقدمه

نشاسته به عنوان پلی‌ساکارید اصلی ذخیره‌ای گیاهان، به دلیل ویژگی‌های عملکردی متعدد نقش مهمی در محصولات غذایی و غیر غذایی دارد. نشاسته به طور کلی از ۲۰-۲۵ درصد آمیلوز و ۷۵-۸۰ درصد آمیلوپکتین تشکیل شده‌است که به همراه مقدار کمی از ترکیبات دیگر در آمیلوپلاست کلیه گیاهان، خصوصاً گیاهان غده‌ای نظیر سیب‌زمینی و دانه‌ی غلات یافت می‌شود. نشاسته‌های مختلف که از منابع مختلف گیاهی به دست می‌آیند دارای تفاوت‌هایی از نظر وزن مولکولی، میزان آمیلوز و آمیلوپکتین و مقدار ترکیبات دیگر مانند چربی‌ها و فسفولیپیدها می‌باشند [۶-۱].

علیرغم کاربردهای مختلف نشاسته، استفاده از نشاسته طبیعی به دلیل ویژگی‌های نامطلوب آن مانند نامحلول بودن در آب سرد، مقاومت کم در برابر حرارت و میزان هضم پایین محدود است [۶ و ۸]. بعلاوه، ویژگی‌های عملکردی و فیزیکوشیمیایی نشاسته بیشتر به جرم مولکولی آن‌ها بستگی دارد. بر این اساس، در مقایسه با نشاسته با جرم مولکولی بالا، نشاسته با جرم مولکولی کمتر به دلیل خواص انتشار و توانایی تولید نانومواد، مفیدتر است [۹]. روش‌های مختلفی برای پلیمریزاسیون و کوتاه کردن زنجیره‌های نشاسته‌ای بدون تغییر شیمیایی در ساختار آنها وجود دارد [۱۰]. علاوه بر این، تولید نشاسته اصلاح شده در صنایع غذایی و غیر غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است. به منظور بهبود ساختار نشاسته و برطرف نمودن کاستی‌های نشاسته‌ی طبیعی، از اصلاحات شیمیایی، فیزیکی و بیوشیمیایی استفاده می‌شود. اصلاح نشاسته به دلیل سازماندهی مجدد پیوندهای هیدروژنی بین مولکول‌های نشاسته و آب، به طور چشمگیری خواص نشاسته مانند شکل، اندازه ذرات، چگالی، مساحت سطح، خواص جریان، حلالیت، تورم و ظرفیت نگهداری آب را تغییر می‌دهد. در بسیاری از موارد، به دلیل آلودگی شیمیایی، نایمن بودن و باقیمانده حلال در محصول، اصلاحات شیمیایی با فناوری‌های سازگار با محیط زیست جایگزین می‌شود. روش‌های فشار بالا و آنزیمی دو تیمار سبز هستند که می‌توان از آنها جهت اصلاح نشاسته استفاده کرد. تیمار فشار بالا به عنوان یک روش جدید اصلاح فیزیکی برای تأثیرگذاری بر خواص فیزیکوشیمیایی نشاسته استفاده شده است.

فشار هیدرواستاتیک بالا، فناوری جدیدی است که بعنوان روش نگهداری و یا استریلیزاسیون مواد غذایی بحساب می‌آید. در این تیمار، ماده‌ی غذایی در معرض فشارهای هیدرواستاتیکی بالا در حد ۱۰۰-۶۰۰ مگاپاسکال قرار می‌گیرند و تغییراتی در آن‌ها اعمال می‌شود. تیمار فشار بالا روشی غیرحرارتی برای انجام اصلاحات فیزیکی در مواد غذایی به حساب می‌آید [۷]. اعمال فشار بالا همانند حضور آب و حرارت منجر به ژلاتینه شدن نشاسته می‌شود که تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای با آن دارد. زمانی که نشاسته در آب گرم متورم می‌شود، ساختار حلقوی و بیضی شکل و در نتیجه بلورینگی خود را بطور کامل از دست می‌دهد، در حالیکه در ژلاتینه شدن تحت فشار بالا، ساختار گرانول‌های نشاسته تغییر می‌کند ولی بطور کامل از بین نمی‌رود. آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) گرانول‌های نشاسته‌ی ژلاتینه شده با استفاده از حرارت و فشار نشان داد که ژلاتینه شدن ناشی از گرما منجر به از دست رفتن ساختار گرانول می‌شود، در حالیکه ژلاتینه شدن ناشی از اعمال فشار بالا منجر به تغییر در ساختار گرانول‌ها می‌شود [۷]. بعلاوه تیمار حرارتی تنها بر گرانول‌های با پایداری کم اثر می‌گذارد، در حالیکه تیمار فشار بالا هم بر گرانول‌های با پایداری کم و هم بر گرانول‌های پایدار تأثیرگذار است. تحقیقات نشان داد که در تیمار فشار بالا، با افزایش فشار، میزان نشت آمیلوز به خارج از گرانول کاهش می‌یابد. در واقع، آمیلوزها بجای اینکه به فاز مایع نشت پیدا کنند، آمیلوز با لیپیدها تشکیل کمپلکس می‌دهند و یا با زنجیره‌های بیرونی آمیلوپکتین برهم‌کنش می‌کنند [۱۱]. ژلاتینه شدن نشاسته توسط تیمار فشار بالا به میزان فشار اعمال شده، زمان انجام تیمار، نوع نشاسته و دمای فرایند بستگی دارد [۷]. نوع نشاسته، منشا گیاهی و میزان آمیلوز نیز در ژلاتینه شدن با تیمار فشار بالا موثر است، به عنوان مثال، بدلیل تفاوت در ساختار گرانول‌ها، نشاسته نوع A نسبت به نوع B و C نسبت به تیمار با فشار بالا حساس‌تر است [۱۱].

تیمار فشار بالا با حذف میکروارگانیسم‌ها منجر به افزایش عمر انبارمانی محصول می‌شود، همچنین این تیمار منجر به اصلاح فیزیکی و عملکردی محصولات نیز می‌گردد.

آنزیم‌ها کاتالیزورهای بیولوژیکی هستند که در واکنش‌های بسیار مهمی شرکت می‌کنند. آلفا آمیلاز، بتا آمیلاز و پروتازها از

بسته بطور کامل خارج شد. به منظور جلوگیری از ایجاد رسوب، بسته‌ها قبل از اعمال فشار، چندین بار تکان داده شدند. نشاسته‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه تحت فشار ۳۰۰ و ۶۰۰ مگاپاسکال قرار گرفتند و آزمایشات مربوطه بر روی آن‌ها انجام شد [۱۷].

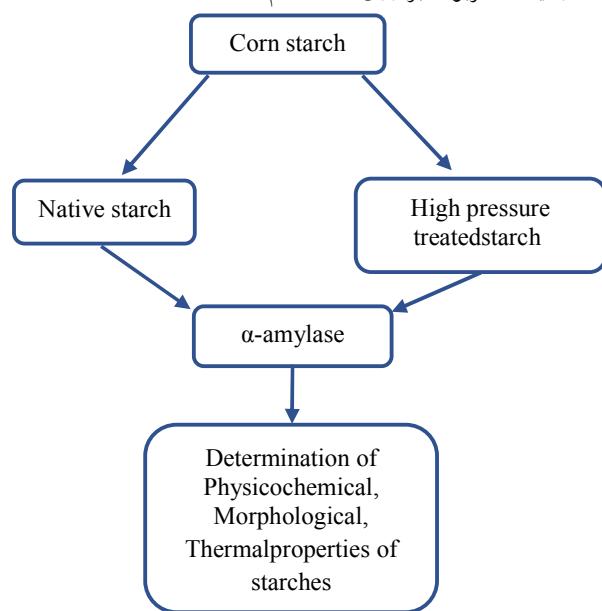


Fig 1 Flow chart of the implemented procedure

## ۲-۳- هیدرولیز آنزیمی نشاسته

نشاسته‌ی ذرت طبیعی و تیمار شده با فشار بالا (هر کدام به میزان ۲۰ گرم) با ۵۰ میلی‌مولار بافر استات سدیم (pH ۵/۵) با ۰/۰۲ درصد آزید سدیم) ترکیب شدند تا وزن کل ۱۰۰ گرم به دست آید. آلفا آمیلاز در سطح ۰/۱۵٪ (وزنی/وزنی) نشاسته خشک) به سوسپانسیون نشاسته اضافه شد و بطری حاوی نمونه به صورت افقی در حمام آب با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به منظور شروع اصلاح آنزیمی تکان داده شد. درصد هیدرولیز نشاسته بر اساس وزن خشک و از معادله‌ی زیر بدست آمد (۱۸):

$$\text{Percentage of hydrolysis} = \frac{\text{Weight of starch (gdb)} - \text{Weight of hydrolyzed starch (gdb)}}{\text{Weight of starch (gdb)}} \times 100$$

## ۲-۴- ویژگی‌های ساختاری

بررسی ساختار و تغییرات سطحی گرانول‌های نشاسته توسط میکروسکوپ الکترونی از نوع نگاره (مدل Leica

انواع این آنزیم‌ها هستند. آلفا آمیلازها در واکنش‌های بیولوژیکی مانند تخمیر، جوانه‌زنی یا هضم بسیار مهم هستند و همچنین به‌طور گسترده در صنعت فرآوری نشاسته مورد استفاده قرار می‌گیرند. آلفا آمیلاز بعنوان آنزیم آمیلولیتیک (آلفا ۱ و ۴ گلوکان-۴-گلوکانوهیدرولاز، EC 3.2.1.1) پیوندهای داخلی آلفا ۱ و ۴ گلیکوزیدی در زنجیره‌های آمیلوز و آمیلوپکتین را می‌شکند و فرآیند مایع‌سازی<sup>۲</sup> و ساکاریفیکاسیون<sup>۳</sup> را انجام می‌دهد [۹-۱۴]. به منظور تغییر ساختار نشاسته، چندین روش آنزیمی استفاده شده است. دپلمریزاسیون زنجیره‌های نشاسته روشی برای تولید نشاسته با جرم مولکولی کم است که به دلیل خواص انتشار و توانایی تولید نانو مواد قابل توجه است.

اگر چه تحقیقاتی در زمینه‌ی تاثیر آنزیم‌های آمیلولیتیکی بر ساختار نشاسته [۱۱-۱۴] و همچنین تاثیر پیش تیمار فشار بالا بر ویژگی‌های نشاسته [۱۵ و ۱۶] وجود دارد، اما تاکنون پژوهشی در زمینه‌ی تاثیر آنزیم آلفا آمیلاز بر نشاسته‌ی پیش تیمار شده با فشار بالا انجام نشده است. در این تحقیق، تاثیر آنزیم آلفا آمیلاز بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، حرارتی و ساختار نشاسته‌ی طبیعی و نشاسته‌ی پیش تیمار شده با فشار ۳۰۰ و ۶۰۰ مگاپاسکال مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

## ۲-۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

نشاسته‌ی ذرت با میزان ۱۳/۵٪ رطوبت، ۰/۴٪ خاکستر، ۱/۱٪ چربی، ۲/۱٪ پروتئین، ۰/۲٪ فیبر و ۲۵/۸٪ آمیلوز از شرکت سپاهان اصفهان خریداری شد. اندازه‌گیری میزان آمیلوز با روش یدی انجام شد [۴]. آنزیم باکتریایی آلفا آمیلاز (EC 3.2.1.1) با درجه‌ی غذایی استخراج شده از باسیلوس لیشنیفورمیس<sup>۴</sup> از شرکت Novozyme دانمارک تهیه شد.

### ۲-۲- تیمار فشار بالا

نشاسته‌ی ذرت تا رسیدن به غلظت ۱۰ درصد (w/v) با آب مخلوط شد و در یک کیسه دو لایه پلی اتیلنی تحت خلا با دوخت حرارتی دربندی شد. قبل از دربندی، گاز موجود در

2. Liquifaction  
3. Saccharification  
4. *Bacillus Licheniformis*

منظور تعیین اختلاف بین میانگین اعداد (۳ تکرار برای هر آزمایش)، پس از آنالیز واریانس از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22، با سطح معناداری  $P < 0.05$  صورت گرفت و رسم نمودارها توسط اکسل ۲۰۱۶ انجام شد.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- تاثیر تیمار فشار بالا بر نشاسته‌ی

##### هیدرولیز شده‌ی ذرت

##### ۳-۱-۱- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

عکس‌های میکروسکوپ الکترونی نمونه‌های نشاسته‌ی طبیعی، نشاسته‌ی تیمار شده با فشار بالا و نشاسته‌ی هیدرولیز شده و تیمار شده با فشار بالا در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تیمار فشار بالا منجر به متلاشی شدن گرانول‌ها و ساییدگی سطح و افزایش تخلخل و تعداد و اندازه‌ی حفره‌ها در سطح گرانول نشاسته می‌شود که با افزایش میزان فشار اعمال شده، میزان متلاشی شدن و تغییر ساختار و اندازه‌ی حفره‌های ایجاد شده در اثر اعمال فشار افزایش می‌یابد. بطوریکه در نمونه‌های تیمار شده با فشار ۳۰۰ مگاپاسکال، نسبت به ۶۰۰ مگاپاسکال، تغییرات سطح گرانول کمتر بود که با تحقیق ژو و لی، ۲۰۱۸ [۱۷] مطابقت دارد [۱۷]. آنها نشان دادند که اعمال فشار تا ۳۰۰ مگاپاسکال تغییر محسوسی بر گرانول‌های نشاسته‌ی کینوا ندارد، درحالی‌که فشار تا ۵۰۰ مگاپاسکال ساختار نشاسته‌ی کینوا را متلاشی می‌کند. نتایج تحقیق ژوولی، ۲۰۱۸ همچنین نشان داد که افزایش فشار تا ۶۰۰ مگاپاسکال شدیداً ساختار هر دو نشاسته‌ی کینوا و ذرت را تخریب کرد. [۱۷] بلاسزاک و همکاران، ۲۰۰۵ و احمد و همکاران، ۲۰۱۶ نشان دادند که در اثر فشار بالا، روی نشاسته‌ی سیب‌زمینی ترک‌ها و حفرات زیاد و عمیقی ایجاد شد [۱۹ و ۱۶]. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، تاثیر آنزیم آلفا آمیلاز بر نشاسته‌ی تیمار شده با فشار بالا بیشتر از نشاسته‌ی طبیعی می‌باشد. منافذ روی سطح گرانول‌های نشاسته می‌تواند سطح نشاسته را افزایش دهد و نفوذ ترکیبات مختلف مانند آنزیم‌ها را در گرانول تسهیل کند. این فرآیند می‌تواند واکنش‌های شیمیایی را تسریع کند و حساسیت مولکول‌های

Cambridge، ساخت کشور انگلیس) صورت گرفت. به این منظور ابتدا مقدار بسیار کمی در حدود ۰/۱ گرم از نمونه با اندازه ۷۵-۱۲۰ میکرومتر روی پایه آلومینیومی دایره‌ای شکل چسبانده و سطح نمونه‌ها توسط دستگاه پوشش‌دهی طلا (Instruments Fisons)، ساخت کشور انگلیس و با عبور جریان گاز آرگون با یک لایه طلا پوشانیده شد. آنگاه نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی یا پتانسیل الکتریکی ۲۰ کیلوولت و بزرگنمایی حدود ۱۰۰۰ برابر مورد مطالعه قرار گرفتند [۴].

#### ۵-۲- آزمون پراش اشعه‌ی ایکس

تعیین الگوی پراش اشعه‌ی ایکس با دستگاه پراش اشعه ایکس (Model D8 Advance، آلمان) انجام شد. با تقسیم مساحت زیر پیک‌ها بر مساحت کل منحنی، از نرم‌افزار (EVA، نسخه ۹،۰) استفاده شد و درجه بلورینگی نشاسته محاسبه شد [۲].

#### ۶-۲- آزمون گرماسنجی افتراقی (DSC)

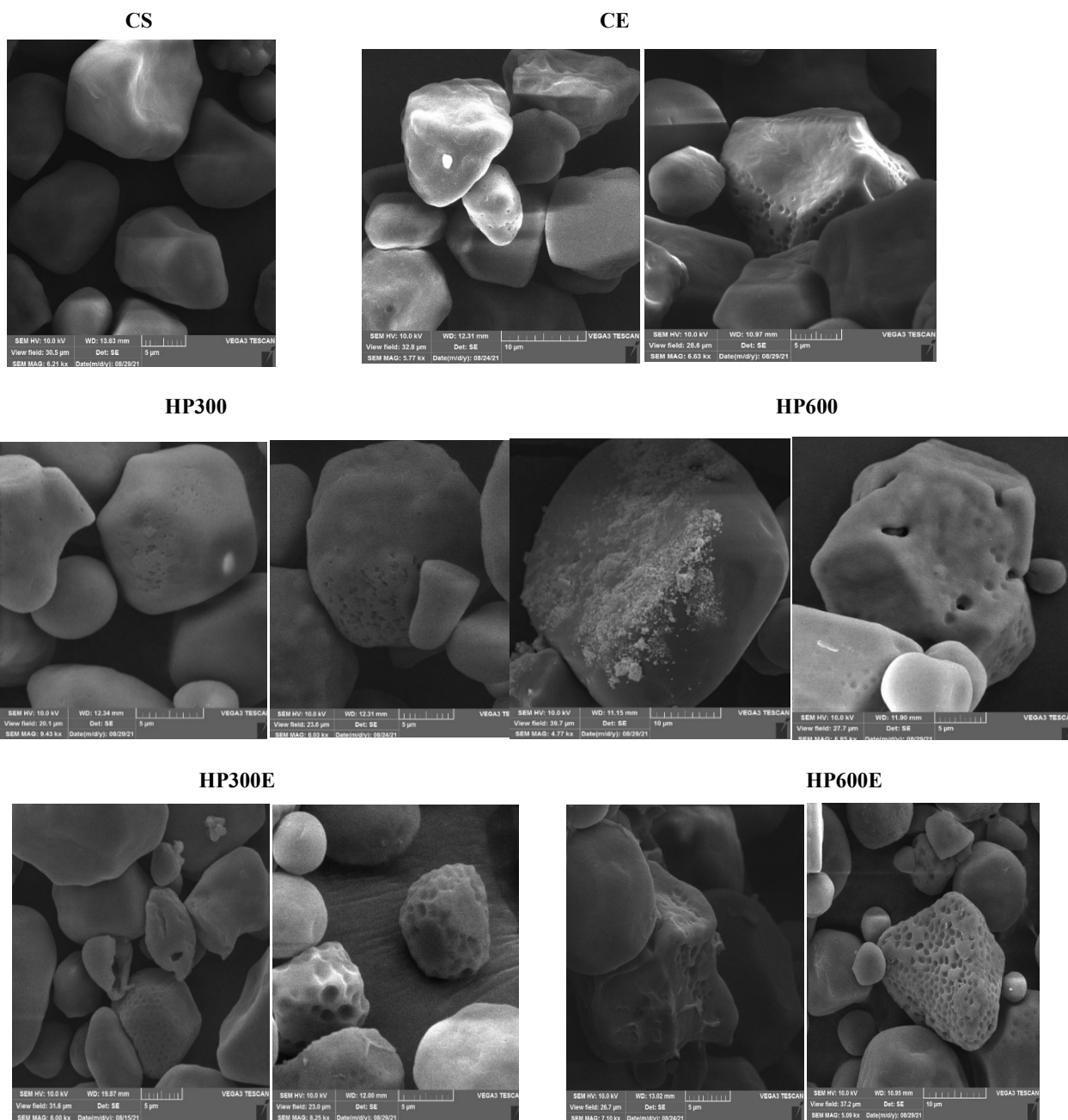
جهت انجام این آزمون از دستگاه DSC (شرکت سناف، OIT, 5000، ایران) استفاده شد. نمونه‌ها به نسبت ۱:۲ (وزنی/وزنی) با آب مقطر ترکیب شده و به مدت یک شب در دمای محیط مخلوط شده تا به تعادل برسند، سپس ۰/۰۳ گرم از نمونه‌ها درون ظروف مخصوص دستگاه وزن شده و درب ظرف روی آن قرار گرفت. پس از صفر کردن دستگاه توسط ظرف خالی، ظرف حاوی نمونه در کوره دستگاه قرار داده شد. جنس پن دستگاه، آلومینیومی بود و از گاز ازت به منظور پاکسازی محفظه نمونه استفاده و برای کالیبره نمودن دما و آنتالپی، فلز قلع بکار گرفته شد. نمونه‌ها با سرعت ۱۰ درجه سانتیگراد در دقیقه از ۲۵ تا ۱۳۰ درجه سانتیگراد حرارت‌دهی شدند و داده‌های مربوط به دمای آغاز ژلاتینه شدن، دمای پایان ژلاتینه شدن و آنتالپی ژلاتینه شدن (بر اساس وزن خشک نشاسته) ثبت گردید. دامنه‌ی دمای ژلاتینه شدن نیز از تفاوت دمای آغاز و پایان ژلاتینه شدن محاسبه شد و از مساحت زیر منحنی آنتالپی ژلاتینه شدن نشاسته محاسبه و گزارش گردید [۴].

#### ۷-۲- آنالیز آماری

برای انجام آنالیز داده‌ها و بررسی اطلاعات بدست آمده از آزمون‌های مختلف از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. به

نتیجه‌ی ایجاد حفره‌ها، کانال‌های بیشتری برای انتشار آنزیم به گرانول‌های نشاسته ایجاد می‌شود که کربوهیدرات بیشتری را برای اتصال به آنزیم در دسترس قرار می‌دهد.

نشاسته را به هیدرولیز آنزیمی افزایش دهد. بنابراین، با ایجاد سوراخ‌ها و منافذ بیشتر، تیمار فشار بالا به آنزیم‌های بیشتری اجازه می‌دهد تا با گرانول‌های نشاسته واکنش دهند. در



**Fig 2** Scanning electron micrographs of CS (corn starch), CE (hydrolyzed corn starch), HP300 (high pressure 300MP), HP600 (high pressure 600MP) HP300E (hydrolyzed high pressure 300MP), HP600E (hydrolyzed high pressure 600MP).

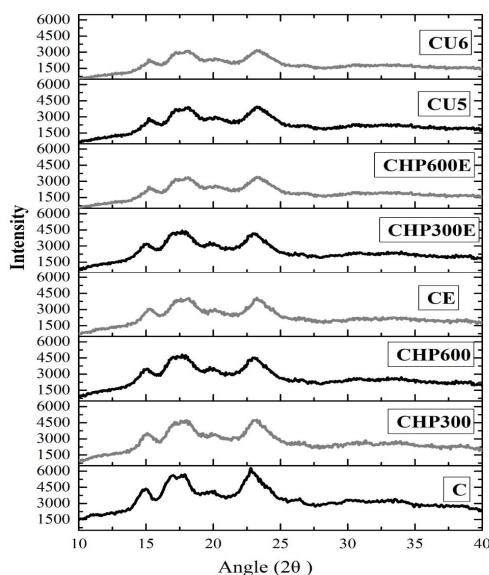
هیدرولیز نشاسته توسط آمیلاز به عوامل متعددی بستگی دارد که شامل غلظت نشاسته، منبع گیاه شناسی گرانول نشاسته، ویژگی‌های سطح (وجود منافذ و کانال‌ها)، ساختار گرانول

### ۳-۱-۲- میزان هیدرولیز نشاسته

درصد هیدرولیز نشاسته‌های طبیعی و نشاسته‌های تیمار شده با ۳۰۰ و ۶۰۰ مگاپاسکال فشار در شکل ۳ نشان داده شده است.

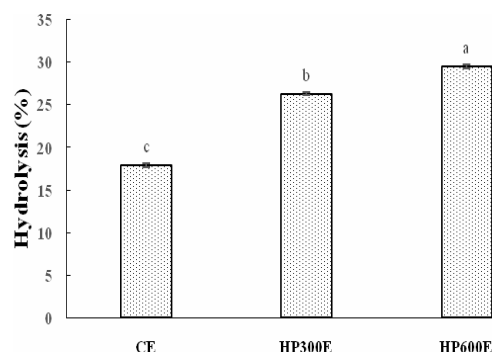
به ۶۰۰ مگاپاسکال کاهش می‌یابد و شدت پیک‌ها در نمونه‌های تیمار شده با فشار بالا، بطور معناداری ضعیفتر می‌باشد که این نتایج با نتایج بالا کریشنا و همکاران، ۲۰۲۰، کاتوپو و همکاران ۲۰۰۲، مطابقت دارد [۲۰ و ۲۱]. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، بلورینگی نشاسته‌ها از ۳۹/۴۵٪ در نشاسته‌ی طبیعی به ۲۸/۴۳٪ در نشاسته‌های تیمار شده با فشار ۶۰۰ مگاپاسکال کاهش یافت.

از طرفی، آلفا آمیلازها با حذف ناحیه آمورف (بی‌شکل) در گرانول‌های نشاسته به طور قابل توجهی بر ساختار نشاسته تأثیر می‌گذارند. آلفا آمیلاز با از بین بردن ساختار کریستالی (کاهش قابل توجه در درجه بلورینگی)، تضعیف مناطق بلوری قوی و باز کردن مارپیچ‌های دوگانه نشاسته‌ها، به ویژه نشاسته‌ی تیمار شده با فشار بالا در مقایسه با نشاسته طبیعی، باعث کاهش میزان بلورینگی نشاسته‌ها می‌شود. پیش تیمارهای فشار بالا می‌توانند به فرآیند هیدرولیز آنزیمی در مناطق کریستالی کمک کنند. به بیان دیگر، تخریب ساختار گرانول‌های نشاسته (همانطور که در شکل ۳ مشاهده شد) در نمونه‌های تیمار شده با فشار بالا به آنزیم آلفا آمیلاز اجازه‌ی واکنش بیشتر با گرانول‌های نشاسته را می‌دهد، بنابراین بلورینگی بیشتر کاهش پیدا می‌کند.



**Fig 4** X-ray diffraction patterns of CS (corn starch), CE (hydrolyzed corn starch), HP300 (high pressure 300MP), HP600 (high pressure 600MP) HP300E (hydrolyzed high pressure 300MP), HP600E (hydrolyzed high pressure 600MP).

(شکل و اندازه)، ترکیب مولکولی (نسبت آمیلوز و آمیلوپکتین و طول زنجیره آمیلوز و آمیلوپکتین) می‌باشند. همانطور که مشاهده می‌شود، نشاسته تیمار شده با فشار بالا بیشتر تحت تاثیر آنزیم آلفا آمیلاز قرار گرفته است. به عبارت دیگر، نشاسته‌های تیمار شده با فشار بالا به هیدرولیز آنزیمی حساس‌تر هستند و نشاسته‌های تیمار نشده مقاومت بیشتری در برابر هیدرولیز آنزیمی از خود نشان می‌دهند. این پدیده می‌تواند به این دلیل باشد که در سطح گرانول‌های نشاسته‌های تیمار شده با فشار بالا، شیارها، فرو رفتگی‌ها، بریدگی‌ها و سوراخ‌هایی وجود دارد که سطح گرانول را دندانه‌دار و ناهموار می‌کنند که منجر به ایجاد گرانول‌های متخلخل‌تر (شکل ۳) و تشکیل کانال‌هایی می‌شوند که قادر به جذب بیشتر آنزیم‌ها هستند (۴). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که نشاسته‌های تیمار شده با فشار بالا، به دلیل ساختارهای بی‌نظم و متلاشی‌تر، مکان‌های بیشتری برای برهم‌کنش آنزیمی دارند.



**Fig 3** Degree of hydrolysis in CE (hydrolyzed corn starch), HP300E (hydrolyzed high pressure 300MP starch), HP600E (hydrolyzed high pressure 600MP starch).

### ۳-۱-۳- آزمون پراش اشعه‌ی ایکس

برای بررسی ساختار کریستالی نشاسته ذرت طبیعی و تیمار شده با فرایند فشار بالا از الگوی پراش اشعه ایکس استفاده شد. نتایج مربوط به میزان بلورینگی نمونه‌های نشاسته‌ی ذرت طبیعی، نشاسته‌های تیمار شده با فشار بالا و نشاسته‌های تیمار شده با فشار بالا و آنزیم، در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، نمونه‌های نشاسته‌ی طبیعی نسبت به نمونه‌های تیمار شده با فشار بالا و آنزیم، دارای میزان بلورینگی بیشتری بودند. نتایج پراش اشعه‌ی ایکس نشان داد میزان بلورینگی نشاسته با افزایش فشار از ۳۰۰

## ۳-۱-۴- آزمون گرماسنج روبشی تفاضلی (DSC)

ژلاتینه شدن نشاسته عبارت است از شکسته شدن نظم مولکولی موجود در گرانول‌های نشاسته که همراه با ظهور تغییرات برگشت‌ناپذیر در خواص نشاسته نظیر تورم گرانولی، از دست رفتن خاصیت حاشیه دوتایی در گرانول‌ها و تغییر حلالیت نشاسته می‌باشد. نتایج مربوط به ویژگی‌های حرارتی نشاسته‌های طبیعی ذرت، تیمار شده با فشار بالا و تیمار شده با فشار بالا و آنزیم آلفا آمیلاز در جدول ۱، آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، در نشاسته‌های تیمار شده با فشار بالا،  $T_p$ ،  $T_o$  و  $T_c$  بطور معناداری کاهش یافته است و با افزایش فشار اعمال شده از ۳۰۰ مگاپاسکال به ۶۰۰ مگاپاسکال، این کاهش بیشتر مشهود است. همانطور که مشاهده می‌شود، پارامتر  $T_o$  از ۷۲/۴ در نشاسته‌ی طبیعی به ۶۷/۸ در نشاسته‌ی تیمار شده با فشار ۶۰۰ مگاپاسکال،  $T_p$  از ۷۶/۴ به ۷۱/۸ در نشاسته‌ی تیمار شده با فشار ۶۰۰ مگاپاسکال و  $T_c$  از ۷۹/۶ در نشاسته‌ی طبیعی به ۷۴/۱ در نشاسته‌ی تیمار شده با فشار ۶۰۰ مگاپاسکال کاهش یافت. این نتایج با نتایج ژوولی، ۲۰۱۸، مطابقت دارد [۱۷]. این پدیده می‌تواند به این دلیل باشد که تیمار با فشار بالا می‌تواند ساختار کریستالی نشاسته را به هم بریزد و تخریب کند (کاهش

بلورینگی در شکل ۴) و این تخریب و تجزیه باعث می‌شود مولکول‌های آب به راحتی به داخل نشاسته نفوذ کنند و واکنش بین نشاسته و آب تسهیل شود و دمای کمتری برای ژلاتینه شدن نشاسته مورد نیاز باشد، بنابراین  $T_p$  و  $T_c$  کاهش یابد. مقادیر  $\Delta H$  در نشاسته‌های تیمار شده با فشار بالا به طور قابل توجهی در مقایسه با نشاسته‌های تیمار نشده کاهش یافت بطوریکه آنتالپی در نشاسته‌ی طبیعی ۱۵/۴ و در نشاسته‌ی تیمار شده با ۶۰۰ مگاپاسکال ۱۱/۴ بود. این پدیده به طور عمده به ماریچ‌های دوگانه آسیب دیده در مناطق کریستالی و غیرکریستالی گرانول‌های نشاسته نسبت داده می‌شود، بنابراین، ساختار مولکول‌ها را می‌توان با مقدار کمتری انرژی متلاشی کرد. سونگیل و همکاران، ۲۰۱۸، وبلازاک و همکاران، ۲۰۰۵ نشان دادند که تیمار فشار بالا در نشاسته‌های مختلف متفاوت است [۲۲، ۱۶]. بطوریکه نشاسته‌ی سیب‌زمینی بیشترین مقاومت را به اعمال فشار دارد، در حالیکه نشاسته‌ی گندم حساس‌ترین نشاسته نسبت به تیمار فشار بالا می‌باشد. همچنین تحقیقات آن‌ها نشان داد که درجه‌ی ژلاتینه شدن در هر فشاری، با افزایش دما افزایش می‌یابد و تیمار فشار بالا فرایندی وابسته به زمان می‌باشد.

**Table 1** Thermal properties of CS (corn starch), CE (hydrolyzed corn starch), HP300 (high pressure 300MP), HP600 (high pressure 600MP) HP300E (hydrolyzed high pressure 300MP), HP600E (hydrolyzed high pressure 600MP).

| $\Delta H_{gel}$ (J/g) | $T_c$ (°C)  | $T_p$ (°C) | $T_o$ (°C)  |        |
|------------------------|-------------|------------|-------------|--------|
| 15.4± 0.3a             | 79.6± 0.4a  | 76.4± 0.2a | 72.4 ± 0.4a | **CS   |
| 14.1± 0.2b             | 78.4 ± 0.5b | 74.2± 0.3b | 71.2 ± 0.3b | CE     |
| 14.5± 0.2b             | 76.5 ± 0.3c | 73.6± 0.4c | 70.2± 0.3c  | HP300  |
| 13.6± 0.3c             | 75.9± 0.3d  | 73.8± 0.3c | 69.6± 0.4c  | HP600  |
| 12.3± 0.4d             | 75.2± 0.6d  | 72.5± 0.5d | 68.6± 0.2d  | HP300E |
| 11.4± 0.2e             | 74.1± 0.4e  | 71.8± 0.6e | 67.8± 0.3e  | HP600E |

\*\*Within the same row, the mean values with different small letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Within the same column, the mean values with different capital letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

آمیلاز باز می‌کند. ساختار کریستالی نشاسته در اثر اعمال فشار بالا و تیمار آنزیمی تخریب می‌شود، بنابراین، در نشاسته‌های تیمار شده با فشار بالا و آنزیم، نسبت به نشاسته‌های طبیعی، مولکول‌های آب راحت‌تر در ناحیه کریستالی نفوذ می‌کنند. بعلاوه، پارامترهای مرتبط با ژلاتینه شدن می‌توانند تحت تأثیر عوامل متعددی مانند نسبت بخش آمورف به کریستالی، طول زنجیره آمیلوپکتین، نشت آمیلوز، اصطکاک بین گرانول‌های متورم و تورم گرانول‌ها اشاره کرد. در اثر تیمار نشاسته‌ی ذرت

در نمونه‌های نشاسته‌ی ذرت تیمار شده با فشار بالا و آنزیم آلفا آمیلاز، میزان کاهش دمای ژلاتینه شدن بیشتر مشهود است. این پدیده می‌تواند بدلیل این باشد که تیمار با فشار بالا حساسیت نشاسته به آنزیم آلفا آمیلاز را افزایش می‌دهد که این پدیده می‌تواند بدلیل ژلاتینه شدن نشاسته در اثر اعمال فشار بالا باشد چرا که فرایند فشار بالا نوعی ژلاتینه شدن سرد به حساب می‌آید. به عبارت دیگر، فرایند فشار بالا با اعمال کمترین میزان حرارت، راهی را برای هضم نشاسته توسط

## ۵- منابع

- [1] Abedi, E., Sayadi, M., & Pourmohammadi, K. (2022). Effect of freezing-thawing pre-treatment on enzymatic modification of corn and potato starch treated with activated  $\alpha$ -amylase: Investigation of functional properties. *Food Hydrocolloids*, 129, 107676.
- [2] Abedi, E., & Pourmohammadi, K. (2020). Aggregation behaviors of sonicated tapioca starch with various strengths of Hofmeister salts under pre-and post-ultrasonic treatment. *Food Hydrocolloids*, 105, 105826.
- [3] Nematpour, M., Abedi, E., & Abedi, E. (2019). A Novel One-pot Protocol for the Cu-Catalyzed Synthesis of Nine 2-Aminobenzimidazole Derivatives from o-Phenylenediamine and Trichloroacetonitrile. *Letters in Organic Chemistry*, 16(2), 99-103.
- [4] Pourmohammadi, K., & Abedi, E. (2020). The effect of pre and post-ultrasonication on the aggregation structure and physicochemical characteristics of tapioca starch containing sucrose, isomalt and maltodextrin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 485-496.
- [5] Abedi, E., Pourmohammadi, K., Jahromi, M., Niakousari, M., & Torri, L. (2019). The effect of ultrasonic probe size for effective ultrasound-assisted pregelatinized starch. *Food and Bioprocess Technology*, 12(11), 1852-1862.
- [6] Abedi, E., Pourmohammadi, K., & Abbasi, S. (2019). Dual - frequency ultrasound for ultrasonic - assisted esterification. *Food science & nutrition*, 7(8), 2613-2624.
- [7] Yang, W., Kong, X., Zheng, Y., Sun, W., Chen, S., Liu, D., ... & Ye, X. (2019). Controlled ultrasound treatments modify the morphology and physical properties of rice starch rather than the fine structure. *Ultrasonics sonochemistry*, 59, 104709.
- [8] Shabana, S., Prasansha, R., Kalinina, I., Potoroko, I., Bagale, U., & Shirish, S. H. (2019). Ultrasound assisted acid hydrolyzed structure modification and loading of antioxidants on potato starch nanoparticles. *Ultrasonics sonochemistry*, 51, 444-450.
- [9] Peres, G. L., Leite, D. C., & Silveira, N. P. D. (2015). Ultrasound effect on molecular weight reduction of amylopectin. *Starch - Stärke*, 67(5-6), 407-414.
- [10] Iida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata,

با فشار بالا، شکستن پیوندهای داخلی و بین مولکولی هیدروژن در زنجیره‌های نشاسته اتفاق می‌افتد (همانطور که در بخش هیدرولیز و پراش اشعه ی ایکس مشاهده شد)، که این پدیده به آزادی این زنجیره‌ها کمک می‌کند. در نتیجه، مولکول‌های آب بیشتری به درون گرانول‌های تیمار شده با فشار بالا نفوذ می‌کنند و آمیلوز می‌تواند با خروج از گرانول‌ها ژلاتینه شدن را با دمای کمتری انجام دهد. به عبارت دیگر، با ایجاد ساختاری باز، تعاملات بین مولکول‌های نشاسته و آب از طریق گروه‌های OH تسهیل می‌شود.

## ۴- نتیجه‌گیری کلی

در پژوهش حاضر، تاثیر آنزیم آلفا-آمیلاز بر نشاسته‌ی ذرت قبل و بعد از تیمار با فشار بالا مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده، آنزیم آلفا-آمیلاز بر نشاسته‌ی تیمار شده با فشار بالا تاثیر معنادارتری داشت. فرایند فشار بالا، بدلیل ایجاد تغییرات ساختاری، تخلخل و شکاف در گرانول‌های نشاسته، جایگاه‌های بیشتری را برای هیدرولیز توسط آنزیم آلفا-آمیلاز بوجود می‌آورد. در نشاسته‌های تیمار شده با فشار بالا و آنزیم، میزان بلورینگی و دماهای ژلاتینه شدن بطور معناداری کاهش یافت و بیشترین تاثیر مربوط به نشاسته‌ی تیمار شده با ۶۰۰ مگا پاسکال فشار بود. نتایج نشان داد نشاسته‌هایی با ساختار آمورف (بی‌شکل) بیشتر و میزان بلورینگی کمتر، نسبت به تیمار آنزیمی حساس‌تر می‌باشند. آلفا-آمیلازها را می‌توان در صنایع غذایی، کاربردهای دارویی، محصولات هیدرولیز شده، نساجی، کاغذ و صنایع شوینده استفاده کرد. همانطور که نتایج نشان داد، تیمار فشار بالا، گرانول‌های نشاسته را به گرانول‌های متخلخل تبدیل کرده و هیدرولیز آنزیم را تسهیل می‌کند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که با تیمار نشاسته‌ها از طریق فرایند فشار بالا، هیدرولیز نشاسته نیز بهبود می‌یابد. در کل می‌توان نتیجه گرفت تیمار نشاسته با فرایند فشار بالا بدلیل اعمال اصلاحات فیزیکی مطلوب می‌تواند ساختار نشاسته را جهت انجام هیدرولیز آنزیمی آماده سازد و در نتیجه مصرف آنزیم در فرایندهای ساکاریفیکاسیون کاهش می‌یابد.

- (2005). Effect of high pressure on the structure of potato starch. *Carbohydrate Polymers*, 59(3), 377-383.
- [17] Li, G., & Zhu, F. (2018). Effect of high pressure on rheological and thermal properties of quinoa and maize starches. *Food Chemistry*, 241, 380-386.
- [18] Villas-Boas, F., & Franco, C. M. (2016). Effect of bacterial  $\beta$ -amylase and fungal  $\alpha$ -amylase on the digestibility and structural characteristics of potato and arrowroot starches. *Food hydrocolloids*, 52, 795-803.
- [19] Ahmed, J., Thomas, L., Taher, A., & Joseph, A. (2016). Impact of high pressure treatment on functional, rheological, pasting, and structural properties of lentil starch dispersions. *Carbohydrate polymers*, 152, 639-647.
- [20] Balakrishna, A. K., Wazed, M. A., & Farid, M. (2020). A review on the effect of high pressure processing (HPP) on gelatinization and infusion of nutrients. *Molecules*, 25(10), 2369.
- [21] Katopo, H., Song, Y., & Jane, J. L. (2002). Effect and mechanism of ultrahigh hydrostatic pressure on the structure and properties of starches. *Carbohydrate Polymers*, 47(3), 233-244.
- [22] Szwengiel, A., Lewandowicz, G., Górecki, A. R., & Błaszczak, W. (2018). The effect of high hydrostatic pressure treatment on the molecular structure of starches with different amylose content. *Food chemistry*, 240, 51-58.
- A., & Kozuka, T. (2008). Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 140-146.
- [11] Kim, J. Y., Park, D. J., & Lim, S. T. (2008). Fragmentation of waxy rice starch granules by enzymatic hydrolysis. *Cereal Chemistry*, 85(2), 182-187.
- [12] Sudan, S. K., Kumar, N., Kaur, I., & Sahni, G. (2018). Production, purification and characterization of raw starch hydrolyzing thermostable acidic  $\alpha$ -amylase from hot springs, India. *International journal of biological macromolecules*, 117, 831-839.
- [13] Song, Z., Zhong, Y., Tian, W., Zhang, C., Hansen, A. R., Blennow, A., ... & Guo, D. (2020). Structural and functional characterizations of  $\alpha$ -amylase-treated porous popcorn starch. *Food Hydrocolloids*, 108, 105606.
- [14] Keeratiburana, T., Hansen, A. R., Soontaranon, S., Blennow, A., & Tongta, S. (2020). Porous high amylose rice starch modified by amyloglucosidase and maltogenic  $\alpha$ -amylase. *Carbohydrate polymers*, 230, 115611.
- [15] Guo, Z., Zeng, S., Zhang, Y., Lu, X., Tian, Y., & Zheng, B. (2015). The effects of ultra-high pressure on the structural, rheological and retrogradation properties of lotus seed starch. *Food Hydrocolloids*, 44, 285-291.
- [16] Błaszczak, W., Valverde, S., & Fornal, J.



## Effect of alpha-amylase on the physicochemical and structural characteristics of corn starch before and after high pressure pretreatment

Pourmohammadi, K.<sup>1\*</sup>, Abedi, E.<sup>1</sup>

1. Associate professor of Food Science and Technology, School of Agriculture, Fasa University, Fasa, Iran.

| ARTICLE INFO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Article History:</b></p> <p>Received 2022/ 07/ 10<br/>Accepted 2022/ 08/14</p> <hr/> <p><b>Keywords:</b></p> <p>Corn starch,<br/>Alpha-amylase,<br/>High-pressure processing,<br/>Physicochemical properties,<br/>Morphological properties.</p> <hr/> <p><b>DOI:</b> 10.22034/FSCT.19.128.293<br/><b>DOR:</b> 20.1001.1.20088787.1401.19.128.28.3</p> <hr/> <p>*Corresponding Author E-Mail:<br/><a href="mailto:kpourmohammadi@yahoo.com">kpourmohammadi@yahoo.com</a></p> | <p>The high-pressure process is a novel non-thermal technology by which food is subjected to a pressure of 100-600 MPa. In this research, the effect of bacterial alpha-amylase on the degree of hydrolysis, crystallinity, morphological and thermal characteristics of natural corn starch before and after high pressure processing (300 and 600 Mpa) was investigated. The results showed that with increasing pressure, the effects of processing on the physicochemical and thermal properties of starch were increased. Also, starches treated with high pressure process were more sensitive to enzymatic hydrolysis. The results of SEM analysis showed that the starches treated with a pressure equal to 600 MPa had the highest porosity, indentation and roughness on the surface of the starch granules and showed the highest sensitivity to enzymatic hydrolysis. The amount of crystallinity in the starches treated with high pressure and enzyme was lower than the natural starch sample due to the destruction of the starch crystal structure. The results of the thermal characteristics of starches showed that with the increase of the applied pressure, the parameters of <math>T_O</math>, <math>T_P</math>, <math>T_C</math> and enthalpy were significantly decreased. The high- pressure processing can create favorable physical modifications on the starch, and because of these modifications, a lower amount of alpha-amylase can be used for starch hydrolysis.</p> |