تأثیر درجه‌ی استخراج آرد و میزان آنزیم آسپارژیناز بر کاهش آسپارژین آزاد در خمیر نان

حبیب واحدی[1] - محمد حسین عزیزی[2] - فرزاد کبارفرد[3]- محسن برزگر[4] - زهره حمیدی اصفهانی[4]

چکیده

زمینه و هدف: در دماهای بالاتر از 120 درجه سانتی گراد یک ماده سرطان زا بنام اکریل آمید در نان ساخته می شود. آسپارژین آزاد موجود در آرد گندم پیش ساز اصلی تشکیل اکریل آمید شناخته شده است. با توجه به اهمیت تغذیه ای و پزشکی اکریل آمید، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر درجه استخراج آرد و آنزیم آسپارژیناز بر کاهش آسپارژین در خمیر نان، انجام شد.

روش تحقیق: برای انجام این تحقیق تجربی دو رقم گندم از استان گلستان تهیه شد و از مخلوط کردن گندم ها دو نوع آرد با درجه استخراج 93 و 82 درصد تولید شد. میزان آسپارژین آزاد در آرد کامل، سبوس و آرد آندوسپرم حاصل از دو رقم گندم و در دو نوع آرد تعیین شد،سپس تاثیر درجه استخراج آرد بر میزان آسپارژین و آنزیم آسپارژیناز بر هیدولیز آسپارژین آزاد در آرد و دو نوع خمیر در شرایط آزمایشگاه و نانوایی بررسی شد. اندازه گیری آسپارژین با کروماتوگرافی مایع باکارآیی بالا و تحلیل داده ها با آزمون تی و من ویتنی انجام شد.

یافته ها: اختلاف معنی داری بین میانگین های آسپارژین آزاد در آرد کامل، سبوس، آرد آندوسپرم و دو نوع آرد مشاهده شد ($p<0/05$). غلظت موثر آنزیم، برای کاهش آسپارژین آزاد در دو نوع خمیر به 500 میلی گرم/ کیلوگرم رسید. راندمان کاهش آسپارژین در دو نوع خمیر نسبت به نمونه شاهد به میزان 88/02 درصد رسید. کاهش آسپارژین با استفاده از غلظت یکسان آنزیم در دو نوع خمیر تفاوت معنی داری نشان نداد ($p>0/05$).

نتیجه گیری: تأثیر رقم گندم و درجه استخراج آرد بر میزان آسپارژین آزاد حتمی است. اما استفاده از آنزیم آسپارژیناز روش مناسبی جهت کاهش آسپارژین در خمیر نان می باشد.

کلید واژه ها: آسپارژین آزاد؛ آنزیم؛ درجه استخراج؛ کروماتوگرافی

افق دانش؛ فصلنامه ی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد (دوره‌ی 18؛ شماره‌ی1؛ بهار1391)

دریافت: 1390/3/6 **اصلاح نهایی: 1390/6/30** **پذیرش: 1390/7/20**

1- دانشجوی دکترای تخصصی تکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

2- **نویسنده‌ی مسؤول؛** دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس،

آدرس: تهران- دانشگاه تربیت مدرس- دانشکده‌ی کشاورزی

تلفن: 021-48292477 **نمابر:** 021- 48292200 **پست الکترونیکی:** mhazizitm@yahoo.com

3- دانشیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

4- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

در دماهای بالاتر از120 درجه سانتی گراد در فرآورده های دارای کربوهیدرات بالا با منشاء گیاهی و حاوی مقدار کمی پروتئین، یک فرآورده جانبی موتاژن و کارسینوژن بنام اکریل آمید با میزان 5000 میکروگرم/کیلوگرم و بالاتر یافت شده است که، سلامت و بهداشت عمومی جامعه را در معرض خطر قرار داده است (3-1). اکریل آمید به واسطه ایجاد جهش در ژن ها و ایجاد چندین نوع سرطان یکی از نگرانی های عمده در مورد سلامت انسان محسوب می شود و عامل بروز سی درصد از موارد سرطانی مشاهده شده در انسان شناخته شده است، مهم تر اینکه هیچ حد ایمنی که از ایجاد سرطان جلوگیری نماید، برای اکریل آمید تعیین نشده است زیرا که حتی غلظت های کم آن، خطر آفرین و سرطان زاست (3). فرآورده های غلات از جمله نان، کراکر، کلوچه، بیسکوئیت و غلات صبحانه، از منابع مهم غذایی، دریافت مقادیر بالای اکریل آمید برای انسان هستند (6-4). اکریل آمید از واکنش بین آسپارژین آزاد و یک منبع کربونیل، طی واکنش میلارد تولید می شود (9-7). آسپارژین آزاد آرد، عامل کلیدی و پیش ساز اصلی تشکیل اکریل آمید در نان و محصولات آردی شناخته شده است. یک راهکار برای کاهش اکریل آمید، کاهش آسپارژین آزاد در مواد خام می باشد. آرد مهم ترین ماده خام و اولیه در تولید نان است و هر چه میزان خاکستر و سبوس در آرد بیشتر باشد به همان میزان آسپارژین آزاد افزایش می یابد. درجه استخراج آرد که با مقدار خاکستر نشان داده می شود، اثر مستقیم بر مقدار آسپارژین آرد و تشکیل اکریل آمید در نان دارد (11,10) اکریل آمید در بدن انسان تجزیه می شود و ماده ای بنام گلاسید آمید را تولید می نماید که با اثر بر DNA و ایجاد جهش در ژن ها، باعث ایجاد سرطان و آسیب به سیستم عصبی می شود (12). مطالعه ای که روی ویفر انجام شد مشخص گردید هنگامی که از آرد با خاکستر 1/05درصد به جای 0/55 درصد استفاده شد، مقدار تشکیل اکریل آمید به دو برابر افزایش یافت که، علت این افزایش را، به زیادتر بودن آسپارژین آزاد، در آرد با خاکستر بالا، نسبت داده اند. تشکیل مقادیر بیشتر اکریلامید در حضور آسپاراژین آزاد نشان می دهد که، این اسید آمینه نقش کلیدی در تشکیل اکریلامید در نان دارد، میزان تشکیل اکریل آمید در نان با غلظت آسپاراژین آزاد در آرد رابطه مستقیم دارد (11,6). تاکنون اکثر راه های پیشنهادی برای کاهش آسپارژین آزاد در بخش کشاورزی، تکنولوژی نانوایی و فرمولاسیون تهیه خمیر نان، نتیجه بخش نبوده است و کاربرد این روش ها نه تنها مقرون به صرفه نمی باشد، بلکه، امکان عملی شدن این تغییرات به صورت صنعتی نیز امکان پذیر نبوده و همچنین، باعث محدود کردن تولید ترکیبات آروماتیک و طعم زا در نان شده اند. استفاده از آنزیم در فرآورده های غلات برای کاهش آسپارژین آزاد در مقیاس صنعتی بجز در مورد بیسکوئیت های نیمه شیرین، تاکنون در دنیا انجام نشده است، سایر مطالعات انجام شده، با مداخله در تکنولوژی و در مدل های آزمایشگاهی انجام شده است. پژوهش حاضر بر اساس راهکارهای سازمان کنفدراسیون صنایع غذایی و آشامیدنی اروپا، بدون هیچگونه مداخله ای در تکنولوژی نانوایی انجام شد (13,11). هدف از انجام این مطالعه سنجش تأثیر آنزیم آسپارژیناز و درجه استخراج آرد بر میزان آسپارژین آزاد (پیش ساز اصلی تشکیل ماده سرطان زای اکریل آمید) در خمیر نان بود.

روش تحقیق

تحقیق حاضر از نوع تجربی است، جهت انجام آن: ابتدا دو رقم گندم (دارای شناسنامه پژوهشی) به دلیل دقت عمل بالا در کشت، فراوانی و سازگاری با آب و هوای شمال ایران، با قابلیت سطح کشت بالا، از ایستگاه تحقیقاتی بذر استان گلستان، بنام رقم N-80-19 (رقم گندم کشت شده در شمال ایران در سال 1380 که در لاین 19 پروژه تحقیقاتی ایسگاه بذر گندم استان گلستان مورد پژوهش قرار گرفته است) و رقم کوهدشت (K)، تهیه شد. از مخلوط کردن دو رقم گندم به نسبت مساوی، دو نوع آرد با درجه استخراج 82 درصد (18 درصد سبوس گیری) و 93 درصد (7 درصد سبوس گیری) در یکی از کارخانه های آرد استان گلستان تولید شد. آنزیم آسپارژیناز محصول شرکت میلبو ایتالیا (14)، نمک طعام بدون ید محصول کارخانه نمک ایوانکی، خمیرمایه فعال محصول شرکت ایران ملاس (15) و مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان تهیه شده اند. مراحل انجام کار 1- جدایی سبوس از آرد آندوسپرم: ابتدا توسط آسیاب چکشی 3100 مدل فالینگ نامبر ساخت آلمان، از هر کدام از ارقام گندم، آرد کامل تهیه شد. سپس رطوبت اولیه و سختی گندم ها

www.SID.ir

توسط دستگاه اسپکتروسکوپی نزدیک مادون قرمز مدل کملزر، برابندر آلمان، در طول موج 1100-700 نانومتر، تعیین شد، هدف از تعیین رطوبت اولیه و سختی در گندم ها تعیین رطوبت ثانویه جهت محاسبه میزان آب مورد نیاز، برای نم زنی گندم ها و تسهیل جدایی سبوس از آرد آندوسپرم بود. بعد از طی دوره استراحت (24ساعت بعد) توسط آسیاب غلتکی کوآدرومات جونیور ساخت آلمان مدل Nr.279002 شماره E 1722، جداسازی سبوس از آرد آندوسپرم انجام شد، و به روش نمونه ی برداری ربع کردن نمونه ی های آزمایشگاهی جهت اندازه گیری آسپارژین آزاد به تعداد 36 نمونه شامل (12نمونه آرد کامل، 12نمونه سبوس و 12نمونه آرد آندوسپرم)، از دو رقم گندم به منظور اندازه گیری آسپارژین آزاد تهیه شد (17,16,7). 2- تولید دو نوع آرد: از مخلوط کردن دو رقم گندم به نسبت مساوی، دو نوع آرد با درجه استخراج 93 و 82 درصد تولید شد. 12 نمونه ی آرد برای تعیین آسپارژین آزاد و 12 نمونه جهت تعیین خاکستر از دو نوع آرد به روش نمونه ی برداری ربع کردن گرفته شد (18). 3- اندازه گیری آسپارژین آزاد توسط دستگاه HPLC[1]: جهت آماده سازی نمونه ها ابتدا 1 تا 2 گرم از هر نمونه، توسط ترازو با دقت 0/0001 گرم توزین شد، و به بالن 100میلی لیتری منتقل شد. سپس 50 میلی لیتر آب مقطر به آن افزوده شد، حدود 15 الی 30 دقیقه هم زده شد، با آب به حجم رسانده شد، جهت مشتق سازی به 0/5 میلی لیتر محلول نمونه ی آماده شده، 0/5 میلی لیتر محلول بافر بورات 0/4 مولار در H =9/5 ، 0/4 میلی لیتر محلول اورتوفتالدئید اضافه شد و 1دقیقه و 15ثانیه سونیک شد. قبل از تزریق نمونه ها به دستگاه HPLC ابتدا محلول استاندارد آسپارژین آزاد به غلظت های (5،۲،۱و0/5) تهیه شد، سپس 0/1 میکروگرم/ میلی لیتر، از هر کدام از غلظت های استاندارد آسپارژین آزاد تهیه شد، و پس از مشتق سازی آن (طبق روش مشتق سازی نمونه)، به HPLC، جهت رسم منحنی کالیبراسیون، در دامنه خطی، تزریق شد. بعد از بدست آوردن شرایط استاندارد (رزولوشن مناسب)، با استفاده از منحنی استاندارد و سطح زیر پیک نمونه، و همچنین با استفاده از ارقام شایستگی روش اندازه گیری آسپارژین آزاد [y= 416/087x +51/83, R2= 99948, n= 4, (0/5-5 ppm] غلظت آسپارژین آزاد در نمونه های مجهول تعیین شد، میزان آسپارژین آزاد موجود در نمونه ها توسط HPLC مدل Agilent/1100 Series/ USA با پارامترهای [روش کار (گرادیانت)، سیستم (معکوس)، دتکتور (آشکارساز) فلورسانس با طول موج های تحریک 360 و نشر 455 نانومتر، ستون از جنس C18 با (طول250 میلی متر، قطر داخلی 4/6 میلی متر با ذرات پر کننده به قطر 5 میکرون (waters, USA) سرعت جریان فاز متحرک 1 میلی لیتر/ دقیقه] تعیین شد. 4- ارزیابی تاثیر آنزیم آسپارژیناز در شرایط آزمایشگاه: مرحله اول ارزیابی فعالیت آنزیم آسپارژیناز بر هیدرولیز آسپارژین خالص و سنجش توانایی آنزیم در تبدیل آسپارژین آزاد به اسید آسپارتیک در آزمایشگاه انجام شد، به نحوی که ابتدا محلول آسپارژین خالص در مقادیر ثابت 100 میلی گرم/ کیلوگرم تهیه شد. سپس غلظت های ۱۰۰،۱۰۰، 50، 50، 20، 20 میلی گرم/ کیلوگرم از آنزیم آسپارژیناز تهیه شد. بعداً به ترتیب در زمان های 30، 30، 30، 15و 15 دقیقه با دمای 28 درجه سانتی گراد و pH=5/8، مشاهده شد که، آنزیم آسپارژیناز توانست بعد از 30 دقیقه، آسپارژین خالص را، به میزان صد درصد هیدرولیز نموده و به اسید آسپارتیک تبدیل نماید. مرحله دوم ارزیابی فعالیت آنزیم بر هیدرولیز آسپارژین آزاد در آرد انجام شد، ابتدا تاثیر آنزیم با غلظت های مختلف 500، 250، 200، 100، 40 و صفر میلی گرم/کیلوگرم، روی میزان هیدرولیز آسپارژین آزاد در آرد بررسی شد (n=3). نتایج آماری نشان داد که مناسبترین غلظت های آنزیم آسپارژیناز در زمان 30 دقیقه جهت هیدرولیز آسپارژین آزاد در آرد غلظت های 500 و 250 میلی گرم/کیلوگرم می باشند. 5- ارزیابی تأثیر آنزیم آسپارژیناز در شرایط نانوایی سنگی: ابتدا 45 کیلوگرم آرد با درجه استخراج 93 درصد، به 3 قسمت مساوی تقسیم شد. سپس با توجه به فرمولاسیون تهیه خمیر نان سنگک، بر مبنای وزن آرد به ازاء هر صد گرم آرد مخمر 0/5 درصد، آب 85 درصد، نمک 1 درصد (19)، 3 سری خمیر بنام A- B- C، تهیه شد، بنحویکه صفر میلی گرم آنزیم به آب خمیر A (به عنوان شاهد)، 250میلی گرم آنزیم به آب خمیر B و 500 میلی گرم آنزیم به آب خمیر C افزوده شد، ابتدا آنزیم در فاز آبی قبل از اضافه کردن مواد خشک کاملاً حل شد (20)، سایر پارامترها (آب، درجه حرارت آب، نمک، آرد، زمان

1- High Performance Liquid Chromatography

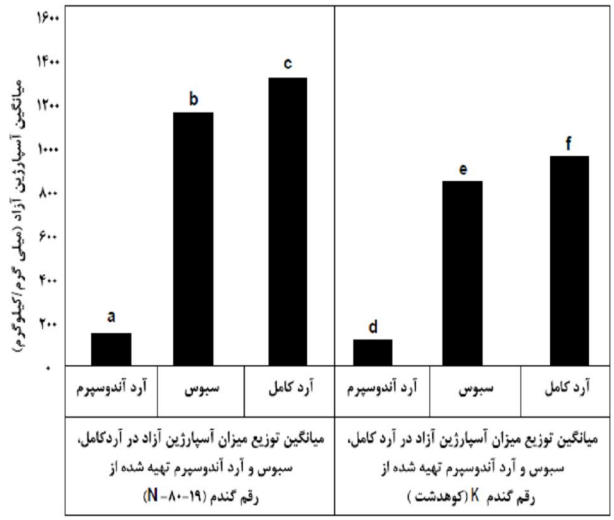
Archive of SID

www.SID.ir

های اختلاط اولیه 10 دقیقه، ثانویه 5 دقیقه، مقدار مخمر و زمان تخمیر 110دقیقه) ثابت نگه داشته شد. بعد از تخمیر 18 نمونه به صورت تصادفی از نقاط مختلف سه خمیر A-B-C انتخاب شد. در پایان میزان غلظت 500 میلی گرم/کیلوگرم، به عنوان غلظت مناسب آنزیم آسپارژیناز، جهت هیدرولیز آسپارژین آزاد در خمیر نان، انتخاب شد. مرحله بعد استفاده از آنزیم به میزان 500 میلی گرم/کیلوگرم جهت هیدرولیز آسپارژین آزاد در دو نوع خمیر در شرایط نانوایی سنگکی مورد بررسی قرار گرفت، جهت انجام این عمل ابتدا دو نوع آرد؛ با درجه استخراج 82 درصد به میزان 100 کیلوگرم، و درجه استخراج 93 درصد به میزان 100 کیلوگرم تهیه شد، سپس به آب هر نوع دو نوع خمیر، آنزیم به میزان 500 میلی گرم/کیلوگرم در حضور شاهد افزوده شد و با ثابت نگهداشتن سایر پارامترها همانند مرحله قبل، خمیرها تهیه شد. بعد از عمل تخمیر 24 نمونه از نقاط مختلف هر دو نوع خمیر (با آنزیم و بدون آنزیم) جهت اندازه گیری آسپارژین آزاد انتخاب شد. 6- اندازه گیری آسپارژین آزاد در نمونه های خمیر: ابتدا نمونه های خمیر با سیستم خشک کن انجمادی، رطوبت زدایی شدند، سپس 0/1 گرم از هر کدام از نمونه ها به آرد تبدیل شد، و بعد از انتقال به لوله فالکون 15 میلی لیتری مدرج، به آن 2 میلی لیتر محلول استونیتریل 25 درصد در آب دو بار تقطیر شده افزوده شد، و مدت 20 دقیقه در حمام اولتراسوند قرار داده شد، تا اسید آمینه آزاد وارد فاز محلول شود. مرحله بعد نمونه های حاصل از استخراج مدت 10دقیقه با 3500 دور/ دقیقه سانتریفوژ شدند، سپس برای مشتق سازی نمونه، 25 میکرولیتر از محلول حاصل از استخراج و استاندارد های مورد استفاده را به میکروتیوب 1/5میلی لیتری منتقل و 300 میکرولیتر از محلول رسوب دهنده به آن افزوده شد، بعد از 30 ثانیه ورتکس، 10 دقیقه در 11000دور/ دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز رویی جداسازی، و به آن 300 میکرولیتر محلول مشتق ساز حاوی بافر بورات و عامل مشتق ساز اورتوفتالدئید افزوده شد، و پس از مخلوط کردن به مدت 5 دقیقه، 10میکرولیتر از هر کدام از نمونه ها جهت اندازه گیری آسپارژین آزاد به دستگاه HPLC تزریق شد (21). 7- نتایج با نرم افزار SPSS نسخه 18 و تحلیل داده ها با آزمون های تی مستقل و من ویتنی انجام شد.

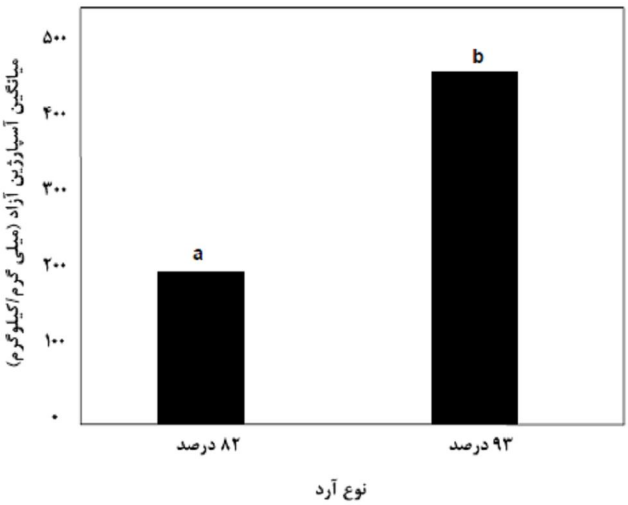
یافته ها

در نمودار 1 تأثیر رقم گندم بر میزان آسپارژین آزاد نشان داده شده است (n=36).



نمودار 1: نمایش تاثیر رقم گندم بر میزان آسپارژین. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها است (p<0/05).

در نمودار2 تأثیر درجه استخراج بر میزان آسپارژین آزاد مشاهده می شود (n=12).

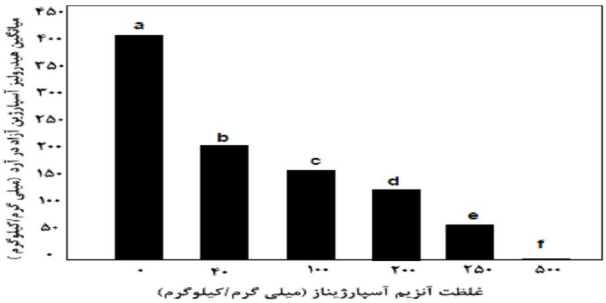


نمودار 2: نمایش تاثیر درجه استخراج آرد بر میزان آسپارژین، حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها است (p <0/05).

نتایج حاصل از اندازه گیری خاکستر در دو نوع آرد نشان داد که، بین میانگین مقدار خاکستر آرد 82 درصد به میزان (0/7 درصد) و خاکستر آرد 93 درصد به میزان (1/4 درصد) تفاوت معنی داری وجود دارد (p<0/05).

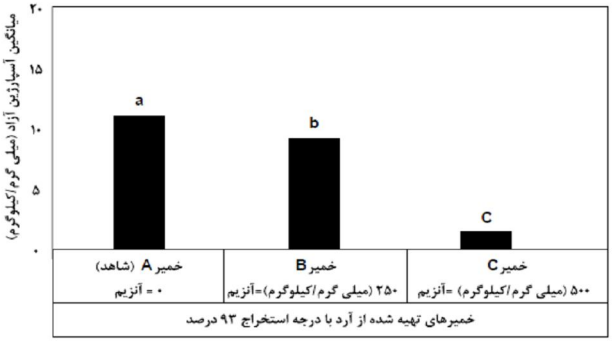
www.SID.ir

در نمودار 3 تأثیر آنزیم آسپارژیناز بر هیدرولیز آسپارژین در مقیاس آزمایشگاهی نشان داده شده است (n=18)



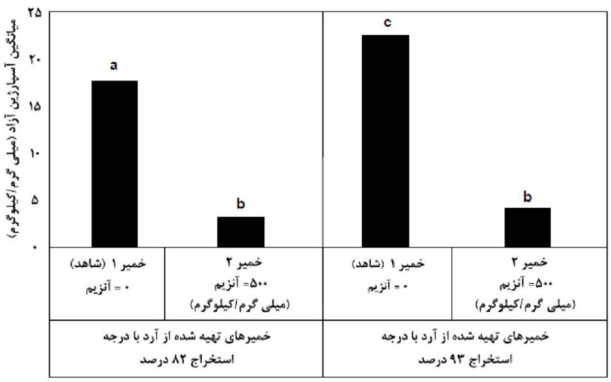
نمودار 3: نمایش تأثیر آنزیم آسپارژیناز بر هیدرولیز آسپارژین آرد در شرایط آزمایشگاه، حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها است (p<0/05).

در نمودار4 تأثیر سطوح مختلف آنزیم آسپارژیناز بر هیدرولیز آسپارژین آزاد در مقیاس صنعتی مشاهده می شود (n =18).



نمودار 4: نمایش تاثیر غلظت های مختلف آنزیم آسپارژیناز در شرایط نانوایی، حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی دار بین میانگین ها است (p < 0/05).

در شکل 5 تاثیر استفاده از از موثرترین غلظت آنزیم آسپارژیناز (500 میلی گرم/کیلوگرم) در شرایط نانوایی بر میزان هیدرولیز آسپارژین در دو نوع خمیر مشاهده می شود (n =24).



نمودار 5: نمایش تاثیر غلظت آنزیم آسپارژیناز بر هیدرولیز آسپارژین در شرایط نانوایی، حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها است (p>0/0 5).

بحث

در شرایط آزمایشگاه تأثیر آنزیم بر هیدرولیز آسپارژین خالص به صورت صددرصد مشاهده شد، اما اثر غلظت موثر آنزیم بر هیدرولیز آسپارژین در آرد 93 درصد و خمیرهای ورنیامده تهیه شده از همین نوع آرد، در غلظت های مختلف، در دامنه 250 تا 500 میلی گرم/کیلوگرم مشاهده شد. اما تاثیر آنزیم روی آسپارژین خمیر در صنعت نانوایی، در 3 سری خمیر تهیه شده از آرد 93 درصد، زمانی که آنزیم به غلظت 250 میلی گرم/کیلوگرم به خمیر اضافه شد، کاهش آسپارژین به میزان 21/70 درصد مشاهده شد، ولی زمانی که آنزیم به غلظت 500 میلی گرم/کیلوگرم به خمیر اضافه شد، کاهش آسپارژین به میزان 87/81 درصد مشاهده شد. با افزایش غلظت آنزیم از 250 به 500 میلی گرم/کیلوگرم یک تفاوت 66/11 درصدی در کاهش آسپارژین مشاهده شد، که این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه استوجانوویک، ساندر و زیزاک، مبنی بر کاهش موثر آسپارژین آزاد توسط آنزیم آسپارژیناز (22) و نتایج حاصله از مطالعه آمرین، مبنی بر کاهش 75 درصدی آسپارژین در خمیر و نان زنجبیلی توسط آنزیم آسپارژیناز (23) و مطالعه وس مبنی بر کاهش 98 -70 درصدی آسپارژین در کراکرهای تهیه شده از گندم توسط آنزیم آسپارژیناز (4) و مطالعات کوآهلین، استوجانوویک، ساندر و زیزاک، مبنی بر اینکه آنزیم آسپارژیناز توانسته است بدون ایجاد تغییر در خواص ارگانولپتیکی محصول و بدون تأثیر بر سایر اسید های آمینه آزاد، میزان آسپارژین آزاد را تا بیش از 90 درصد کاهش دهد (22) و با نتیجه تحقیقات ادوآردو، مبنی بر تأثیر 88 درصدی آسپارژیناز بر هیدرولیز آسپارژین، بدون تاثیر بر پروسه فعالیت آنتی اکسیدانی و عدم افزایش هیدروکسی متیل فورفورال (7) و با نتیجه مطالعه مونیکا مبنی بر حذف آسپارژین توسط آنزیم آسپارژیناز در بیسکوئیت بدون تاثیر بر رنگ نهایی محصول، همسوئی دارد (13). پژوهش حاضر نشان داد، زمانی که از غلظت برابر انزیم آسپارژیناز (500 میلی گرم/کیلوگرم) در دو نوع خمیر تهیه شده از دو نوع آرد با درجه استخراج 93 درصد و 82 درصد در حضور شاهد استفاده شد، میزان آسپارژین آزاد در خمیرها، در دامنه 80/02-46/ 75 درصد کاهش یافت. مهم تر اینکه نسبت کاهش آسپارژین (آسپارژین هیدرولیز نشده) در هر دو نوع خمیر تهیه شده (با

Archive of SID
www.SID.ir

آنزیم) یکسان است و اختلاف معنی داری در کاهش آسپارژین توسط آنزیم در دو نوع خمیر مشاهده نشد. این نتیجه با نتایج مطالعات هانه، مبنی بر کاهش 90-34 درصدی آسپارژین در بیسکوئیت های نیمه شیرین و نان زنجبیلی و نان ترد توسط آنزیم آسپارژیناز، همسوئی دارد (15). مطالعه حاضر نشان داد بین مقادیر آسپارژین در آرد کامل، سبوس و آرد آندوسپرم تهیه شده از دو نوع گندم، اختلاف معنی وجود دارد. که این نتایج با نتایج حاصل از تحقیقات اسپرینگر و همکاران، در مورد چاودار همخوانی دارد، با این تفاوت که، این سه محقق، بر روی میزان توزیع آسپارژین در سبوس و آرد اندوسپرم اظهار نظری ننموده، و مهم تر اینکه، اثر تفاوت میزان توزیع آسپارژین در سبوس، آرد آندوسپرم، تاثیر درجه استخراج آرد بر تشکیل اکریل آمید در نان و اثر آنزیم آسپارژیناز بر کاهش آسپارژین آزاد، توسط این سه محقق در خمیر بررسی نشده است (10). اما در تحقیق حاضر، ضمن تعیین میزان توزیع آسپارژین در سبوس و آرد آندوسپرم در دو نوع گندم؛ اثر میزان آسپارژین در سبوس، آرد آندوسپرم، تاثیر درجه استخراج آرد و آنزیم آسپارژیناز بر کاهش آسپارژین در خمیر و همچنین نقش مخمر نانوایی در مقایسه با آنزیم بر کاهش آسپارژین به طور جداگانه مورد بررسی قرارگرفته است که نتایج آن در مقالات بعدی منتشر شده است. تحقیق حاضر نشان داد که میزان آسپارژین آزاد در آرد های با درجه استخراج 82 درصد (18 درصد سبوس گیری) 62/33 درصد، کمتر از آرد های با درجه استخراج 93 درصد (7 درصد سبوس گیری) می باشد، که این نتیجه با مطالعه ای که توسط کلاس، بر روی ویفر انجام گرفته است همسوئی دارد (11,6) و تغییر درجه استخراج آرد از 93 درصد به 82 درصد، باعث کاهش 50 درصد میزان خاکستر در آرد شد، که این نتایج با مطالعه اسپرینگر (10)، کلاس (11)، مبنی بر اینکه، با افزایش درجه استخراج آرد میزان سبوس و خاکستر افزایش، و متعاقب آن میزان آسپارژین آزاد در آرد آفزایش می یابد، مطابقت دارد و هرچه درجه استخراج آرد کمتر باشد، سبوس بیشتری گرفته شده و به همان نسبت از میزان آسپارژین در آرد کاسته می شود. همچنین با نتایج تحقیقات هانسن (24) مبنی بر اینکه؛ میزان خاکستر و آسپارژین آرد مرتبط ترین عامل کلیدی است که مستقیما ساخت اکریلامید را در فرآورده های نانوایی تحت تأثیر قرار می دهد، همسو می باشد. دیگر یافته این تحقیق وجود اختلاف معنی داری از نظر آماری، بین میزان آسپارژین در دو رقم گندم می باشد. این یافته با نتایج حاصل از تحقیقات بیدرمن (19)، اسپرینگر (10)، موترام (25)، هالفورد (26) و رومینز (27)، کلاس (11)، مبنی برتاثیر رقم و ژنوتیپ گندم بر میزان آسپارژین آزاد آرد، همسویی دارد. اما با نتایج مطالعه لرنر (28) که تفاوت میزان آسپارژین را به شرایط آب و هوایی و افزایش کود نیتروژنه و کمبود سولفات نسبت داد، نا همسو می باشد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد: 1- تأثیر رقم گندم بر میزان آسپارژین آزاد موجود در آرد حتمی است. 2- بیشترین میزان توزیع آسپارژین آزاد در در سبوس مشاهده شد، لذا درجه استخراج آرد عامل تاثیر گذاری بر میزان خاکستر و آسپارژین آزاد می باشد. 3- آنزیم آسپارژیناز روش مناسبی جهت کاهش آسپارژین آزاد در خمیر نان می باشد و بر خلاف سایر آنزیم ها، احتیاجی به جدا سازی بعدی ندارد و از نظر اقتصادی استفاده از آن در صنایع نانوایی مقرون به صرفه می باشد. زیرا، در همان لحظات اول پخت، غیر فعال شده و هیچگونه خطری متوجه انسان یا نان نمی شود. همچنین سبب افزایش تنوع در تولید آرد می شود و خطرات مضر تغذیه ای ناشی از مصرف آرد با درجه استخراج بالاتر (حاوی سبوس، خاکستر و آسپارژین بیشتر) را در تهیه خمیر نان مرتفع نموده، و ضمن حفظ ارزش تغذیه ای سبوس، توقعات مصرف کنندگان نان های حاوی سبوس بالا را، بر طرف کرده و نهایتا از ایجاد سرطان در جامعه جلوگیری خواهد شد. 4- از مهمترین مشکلات و محدودیت های پروژه های تحقیقاتی، در ارتباط با استفاده از آنزیم ها در صنعت غذا از جمله تحقیق حاضر، در مرحله اول گرانی آنزیم ها، و در مرحله بعد عدم وجود واحد استاندارد جهانی برای آنزیم ها می باشد. که، خود یکی از مشکلات اصلی است، چرا که برای استاندارد کردن آنزیم شرایط مطلوب، از جمله (پ هاش، درجه حرارت، غلظت سوبسترا، غلظت آنزیم، قدرت یونی، حضور و غلظت کوفاکتور ها و کوآنزیم ها) لازم است. ایجاد شرایط مطلوب در آزمایشگاه امکان پذیر می باشد، و لی در صنعت امری امکان ناپذیر است و غالبا شرایط مطلوب آزمایشگاهی در اندازه

www.SID.ir

صنعتی قابل اجرا نیست، و برای هر تحقیق محققین بایستی تعیین مقدار نمایند (همانند تحقیق حاضر)، که این مسئله هم وقت گیر است و هم هزینه های زیادی را در بر دارد. مشکل دیگر در زمینه آنزیم آسپارژیناز، نداشتن واحد بین المللی است، و هیچ شرکتی دوز دقیقی اعلام ننموده است، و این نکته را نباید از نظر دور داشت که، همیشه بین اسناد علمی - پژوهشی و کاربردهای صنعتی یک آنزیم اختلاف جزئی وجود دارد، این اختلاف جزئی همان اسرار صنعتی است که تولید کنندگان صنعت غذا، تمام تلاش خودرا در جهت حفظ و عدم آشکارسازی آن بکار می برند. و تا کنون هیچ تولید کننده ای اطلاعات مربوط به نوع سوش تولید کننده آنزیم را عنوان ننموده است. فقط گفته می شود آنزیم آسپارژیناز مترشحه از کپک آسپرژیلوس اوریزه، نوع سوش آن. در Data sheet فقط به ذکر واژه Aspergillus Oryzae که مفهوم آن گونه های آسپرژیلوس اوریزه می باشد اکتفا می نمایند و محققین بایستی توجه داشته باشند که در رابطه با آنزیم ها کمپانی های تولید کننده موارد ذیل اعلام نمی کنند: نوع سوش، دستور ویژه غذایی میکرو اورگانیزم، درصد خالص آنزیم، نوع کاریرها و حامل ها ی آنزیم و شرایط محیطی تولید آنزیم ازجمله: فضای تولید، ارتفاع از سطح دریا، جنس فلز بدنه فرمانتور و دوز دقیق کاربردی آنزیم.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل قسمتی از رساله دکترای تخصصی تکنولوژی مواد غذایی بوده که موضوع آن به تصویب شورای پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس رسیده و به شماره 82/4002 ثبت شده است. بدین وسیله از کلیه اساتید، خصوصاً آقای دکتر منوچهر حامدی استاد دانشگاه تهران، ارگان های دولتی و غیر دولتی و همه کسانی که به نحوی در انجام این تحقیق مؤثر بوده اند و دانشگاه تربیت مدرس به خاطر تامین بخشی از هزینه ها تشکر می شود.

References:

1. Lingnert H. Acryl amide in food: Mechanisms of formation and in uencing factors during heating of food. Scandin J Nutr 2002; 46(4): 159-172.

2. Low M. Effect of citric acid and lysine addition on acryl amide and flavor in a potato model system. J Agricul Food Chemist 2006; 54(16): 5976-5983.

3. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P. Analysis of acryl amide, a carcinogen formed in heated food stuffs. J Agricul Food Chemist 2002; 50(17): 4998-5006.

4. Vass M, Amrein T M, Schoanbaa chler B, Escher F, Amado R. Ways to reduce acryl amide formation in cracker products. Czech of Food Sci 2004; 22(Special Issue): 19-21.

5. Swenson K. Dietary intake of acryl amide in Sweden. Food Chemist Toxicol 2003; 41(11): 1581-1586.

6. Claus A. Acryl amide in cereal products: a review. J Cereal sci 2008; 47(2): 118-133.

7. Edoardo C. Effect of flour type on Maillard reaction and acryl amide formation during tosting of bread crisp model systems and mitigation strategies. Food Res Intl 2009; 42(9): 1295-1302.

8. Lindsay R C. Model systems for evaluating factors affecting acryl amide formation in deep fried foods. Chemist Safety Acryl amide in Food 2005; 561: 329-341.

9. Stadler R H, Blank I, Varga N. Acrylamide from Maillard reaction products. Nature 2002; 419(6906): 449-450.

10. Springer M, Fischer T, Lehrack A, Freund W. Development of acryl amide in baked products. Getride Mehl und Brot 2003; 57(5): 274-278.

11. Claus A. Influence of agronomic factors and extraction rate on the acryl amide contents in veast-leavened breads. J Food Chemist 2006; 54(23): 9876-9886.

12. Richmond P. Acrylamide in food. Lancet 2007; 361(2): 361-362.

13. CIAA. The CIAA acryl amide toolbox for the reduction of acryl amide in flour: Confederation of the Food and Drink Industries of the EU (CIAA); 2009.

14. Hanne V. Evaluating the potential acryl amide mitigation in a range of food products using an asparagiase from aspergillus oryzae. J Agricul Food Chemist 2009; 57(10): 4168-4176.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Zamani J. A novel feeding method in commercial Baker`s yeast production. J Appl Microbiol 2008; 105(3): 674-680.

16. Ono H, Chuda Y, Ohnishi-Kameyama M. Analysis of acryl amide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. Food Addit Contamin 2003; 20(3): 215-220.

17. AOAC. Methods (971.18,925.09.03). Association of official analysis chemistry. MN, USA; 2005.

18. Biederman M. Two GC-MC methods for the analysis of acryl amide in food. Mitt Lebensm. Hyg 2002; 93(6): 638-652.

19. Faridi H A, Finney P. Technical and nutritional aspects of Iranian breads bakers. Digfst 1980; 54(5): 18-22.

20. Monica A, Barbara Q, Jesus F. Modelling the effect asparaginase in reducing acryl amide formation in biscuits. Food Chemist 2011; 126(2): 435-440.

21. Wang A, Lee S, Shuang M. HPLC studies on acryl amid in deep- fried fluor-based indigenous Chines food. J Microchem 2008; 89(2): 90-97.

22. Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M. Acryl amide formation mechanism in heated foods. J Agricul Food Chemist 2003; 51(16): 4782-4787.

23. Amrein T M, Schonbachler B, Escher F, Amado R. Ways for acryl amide in gingerbread: critical factors for formation and possible reduction. J Agricul Food Chemist 2004; 52(13): 4282-4288.

24. Hansen H. Grain characteristics chemical composition, and functional of rye (Scale cereal L) as influenced by genotype and harvest year. J Agricul Food Chemist 2004; 52(8): 2282-2291.

25. Mottram D. Formation of high levels of acrylamide during the processing of flour derived from sulfate-deprived wheat. J Agricul Chemist 2006; 54(23): 8951-8955.

26. Halford N. Genetic and argonimic approaches to decreasing acryl amide precursors in crop plants. Food Additives. Contam 2007; 24(Suppl 1): 26-36.

27. Rommens C. Improving potato storage and processing characteristics through all- native DNA transformation. J Agricul Food Chemist 2007; 54(26): 9882-9887.

28. Lerner S. N-fertilliser effects-on grain composition, industrial quality and end-use in durum wheat. J Cereal Sci 2006; 44(1): 2-11.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of Flour Extraction Rate and Amount of Asparaginase Enzyme on Reduction Free Asparagine in Bread Dough

Habib Vahedi[1], Mohammad Hossein Azizi[2], Farzad Kobarfard[3], Mohsen Barzegar[4] and Zohre Hamidi Esfahani[4]

Abstract

Background and Aim: Acrylamide, a carcinogen material, is produced in temperatures above 120 °C in bread. Free asparagine in wheat flour is the basic factor in acrylamide formation in bread. In accordance with its nutritional and medical importance, the aim of this study was to study the effect of flour extraction rate and asparaginase enzyme on reducing the free asparagine in bread dough.

Materials and Methods: To perform this experimental study, two types of wheat were obtained from Golestan province, and two kinds of flour were produced with 93% and 82% extraction rate by mixing the two kinds of wheat. The value of free asparagine in whole flour, bran and endosperm flour obtained from the two varieties of wheat and in two kinds of flour was determined. Then, the effect of the flour extraction rate on free asparagine and asparaginase enzyme on the hydrolysis of free asparagine in flour and the two varieties of dough was investigated in laboratory and bakery conditions. The free asparagine by liquid chromatography with high efficiency was measured, and the data were analyzed through independent t-test and Mann-Whitney.

Results: A significant difference was observed between the means of free asparagine in whole flour, bran, endosperm flour and the two kinds of flour ($p<0.05$). The suitable density of asparaginase enzyme for reducing free asparagine in two kinds of dough was 500 mg/kg. Reduction of asparagine by the use of similar density of the enzyme in the two kinds of dough was not significant, 88.02% ($p>0.05$).

Conclusion: The effect of wheat variety and flour extraction rate on free asparagine value is inevitable, but using asparaginase enzyme is a useful way to reduce asparagine in bread dough.

Keywords: Enzyme, extraction rate, free asparagine, HPLC

Received: 27 May 2011 **Revised:** 21 September 2011 **Accepted:** 12 October 2011

Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 2012; Vol. 18, No.2

1- PhD Student in Food Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- **Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Food Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 48292477 **Fax:** +98 21 48292200 **E-mail:** mhazizitm@yahoo.com
3- Associate Professor, Department of Chemical and Medicine, School of Pharmaceutics , Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Department of Food Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Archive of SID

www.SID.ir