

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

حبیب واحدی¹ - محمد حسین عزیزی² - فرزاد کبارفرد³ - محسن برزگر⁴ - زهره حمیدی اصفهانی⁴

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 تأثیر درجه استخراج آرد بر میزان آسپارژین و آنزیم آسپارژیناز بر هیدولیز آسپارژین آزاد در آرد و دو نوع خمیر در شرایط آزمایشگاه و نانوائی بررسی شد. اندازه گیری آسپارژین با کروماتوگرافی مابع با کارایی 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 (دوره ی 18؛ شماره ی 1؛ بهار 1391)

پذیرش: 1390/7/20

اصلاح نهایی: 1390/6/30

دریافت: 1390/3/6

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

2- نویسنده ی مسؤل؛ دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس،

آدرس: تهران - دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده ی کشاورزی

پست الکترونیکی: mhazizitm@yahoo.com

نمبر: 021-48292200

تلفن: 021-48292477

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

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

مقدمه

مستقیم دارد (11,6). تاکنون اکثر راه‌های پیشنهادی برای کاهش آسپارژین آزاد در بخش کشاورزی، تکنولوژی نانویی و فرمولاسیون تهیه خمیر نان، نتیجه بخش نبوده است و کاربرد این روش‌ها نه تنها مقرون به صرفه نمی‌باشد، بلکه، امکان عملی شدن این تغییرات به صورت صنعتی نیز امکان‌پذیر نبوده و همچنین، باعث محدود کردن تولید ترکیبات آروماتیک و طعم‌زا در نان شده‌اند. استفاده از آنزیم در فرآورده‌های غلات برای کاهش آسپارژین آزاد در مقیاس صنعتی بجز در مورد بیسکوئیت‌های نیمه شیرین، تاکنون در دنیا انجام نشده است، سایر مطالعات انجام شده، با مداخله در تکنولوژی و در مدل‌های آزمایشگاهی انجام شده است. پژوهش حاضر بر اساس راهکارهای سازمان کنفدراسیون صنایع غذایی و آشامیدنی اروپا، بدون هیچگونه مداخله‌ای در تکنولوژی نانویی انجام شد (11,13). هدف از انجام این مطالعه سنجش تأثیر آنزیم آسپارژیناز و درجه استخراج آرد بر میزان آسپارژین آزاد (پیش‌ساز اصلی تشکیل ماده سرطان‌زای اکریل‌آمید) 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 ایستگاه 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 سبوس‌گیری) و 93 درصد (7 درصد سبوس‌گیری) در یکی از کارخانه‌های آرد استان گلستان تولید شد. آنزیم آسپارژیناز محصول شرکت میلیبو 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 شده‌اند. 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 گندم‌ها

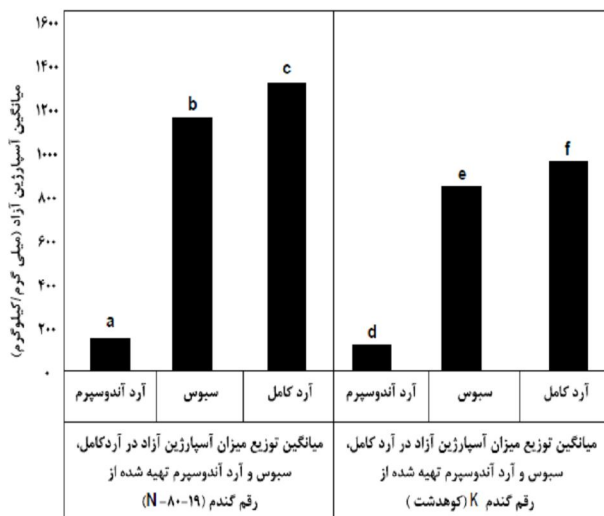
در دماهای بالاتر از 120 درجه سانتی‌گراد در فرآورده‌های دارای کربوهیدرات بالا با منشاء گیاهی و حاوی مقدار کمی پروتئین، یک فرآورده جانبی موتاژن و کارسینوژن بنام اکریل‌آمید با میزان 5000 میکروگرم/کیلوگرم و بالاتر یافت شده است که، سلامت و بهداشت عمومی جامعه را در معرض خطر قرار داده است (1-3). اکریل‌آمید به واسطه ایجاد جهش در ژن‌ها و ایجاد چندین نوع سرطان یکی از نگرانی‌های عمده در مورد سلامت انسان محسوب می‌شود و عامل بروز سی درصد از موارد سرطانی مشاهده شده در انسان شناخته شده است، مهم‌تر اینکه هیچ حد ایمنی که از ایجاد سرطان جلوگیری نماید، برای اکریل‌آمید تعیین نشده است زیرا که حتی غلظت‌های کم آن، خطر آفرین و سرطان‌زاست (3). فرآورده‌های غلات از جمله نان، کراکر، کلوچه، بیسکوئیت و غلات صبحانه، از منابع مهم غذایی، دریافت مقادیر بالای اکریل‌آمید برای انسان هستند (4-6). اکریل‌آمید از واکنش بین آسپارژین آزاد و یک منبع کربونیل، طی واکنش میلارد تولید می‌شود (7-9). آسپارژین آزاد آرد، عامل کلیدی و پیش‌ساز اصلی تشکیل اکریل‌آمید در نان و محصولات آردی شناخته شده است. یک راهکار برای کاهش اکریل‌آمید، کاهش آسپارژین آزاد در مواد خام می‌باشد. آرد مهم‌ترین 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 می‌یابد. درجه استخراج آرد که با مقدار خاکستر نشان داده می‌شود، اثر مستقیم بر مقدار آسپارژین آزاد و تشکیل اکریل‌آمید در نان دارد (10,11) اکریل‌آمید در بدن انسان تجزیه می‌شود و ماده‌ای بنام گلاسید آمید را تولید می‌نماید که با اثر بر DNA و ایجاد جهش در ژن‌ها، باعث ایجاد سرطان و آسیب به سیستم عصبی می‌شود (12). مطالعه‌ای که روی ویفر انجام شد مشخص گردید هنگامی که از آرد با خاکستر 1/05 درصد به جای 0/55 درصد استفاده شد، مقدار تشکیل اکریل‌آمید به دو برابر افزایش یافت که، علت این افزایش را، به زیاده‌تر بودن آسپارژین آزاد، در آرد با خاکستر بالا، نسبت داده‌اند. تشکیل مقادیر بیشتر اکریلامید در حضور آسپارژین آزاد نشان می‌دهد که، این اسید آمینه نقش کلیدی در تشکیل اکریلامید در نان دارد، میزان تشکیل اکریل‌آمید در نان با غلظت آسپارژین آزاد در آرد رابطه

غلظت اسپارژین آزاد در نمونه های مجهول تعیین شد، میزان اسپارژین 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 (طول) 250 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 اسپارژیناز در شرایط آزمایشگاه: مرحله اول ارزیابی فعالیت آنزیم اسپارژیناز بر هیدرولیز اسپارژین خالص و سنجش توانایی آنزیم در تبدیل اسپارژین آزاد به اسید اسپارتیک در آزمایشگاه انجام شد، به نحوی که ابتدا محلول اسپارژین خالص در مقادیر ثابت 100 میلی گرم/ کیلوگرم تهیه شد. سپس غلظت های 100، 50، 20، 50، 20، 50 میلی گرم/ کیلوگرم از آنزیم اسپارژیناز تهیه شد. بعداً به ترتیب در زمان های 30، 30، 30، 15 و 15 دقیقه با دمای 28 درجه سانتی گراد و pH=5/8، مشاهده شد که، آنزیم اسپارژیناز توانست بعد از 30 دقیقه، اسپارژین خالص را، به میزان صد درصد هیدرولیز نموده و به اسید اسپارتیک تبدیل نماید. مرحله دوم ارزیابی فعالیت آنزیم بر هیدرولیز اسپارژین 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 اسپارژین آزاد در آرد بررسی شد (n=3). نتایج آماری نشان داد که مناسبترین غلظت های آنزیم اسپارژیناز در زمان 30 دقیقه جهت هیدرولیز اسپارژین آزاد در آرد غلظت های 500 و 250 میلی گرم/کیلوگرم می باشند. 5- ارزیابی تاثیر آنزیم اسپارژیناز در شرایط نانوائی 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)، 250 میلی 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

توسط دستگاه اسپکتروسکوپی نزدیک مادون قرمز مدل کملز، برابندر آلمان، در طول موج 700-1100 نانومتر، تعیین شد، هدف از تعیین رطوبت اولیه و سحتی 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 (24 ساعت 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 اسپارژین آزاد به تعداد 36 نمونه شامل (12 نمونه آرد کامل، 12 نمونه سبوس و 12 نمونه آرد آندوسپرم)، از دو رقم گندم به منظور اندازه گیری اسپارژین آزاد تهیه شد (7، 16، 17). 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 اسپارژین آزاد و 12 نمونه جهت تعیین خاکستر از دو نوع آرد به روش نمونه ی برداری ربع کردن گرفته شد (18). 3- اندازه گیری اسپارژین آزاد توسط دستگاه HPLC: 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 100 میلی 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 1 دقیقه و 15 ثانیه سونیک شد. قبل از تزریق نمونه ها به دستگاه HPLC ابتدا محلول استاندارد اسپارژین آزاد به غلظت های (5، 1، 2 و 0/5) تهیه شد، سپس 0/1 میکروگرم/ میلی لیتر، از هر کدام از غلظت های استاندارد اسپارژین 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 اسپارژین آزاد [y= 416/087x + 51/83, R2= 99948, n= 4, (0/5-5 ppm]

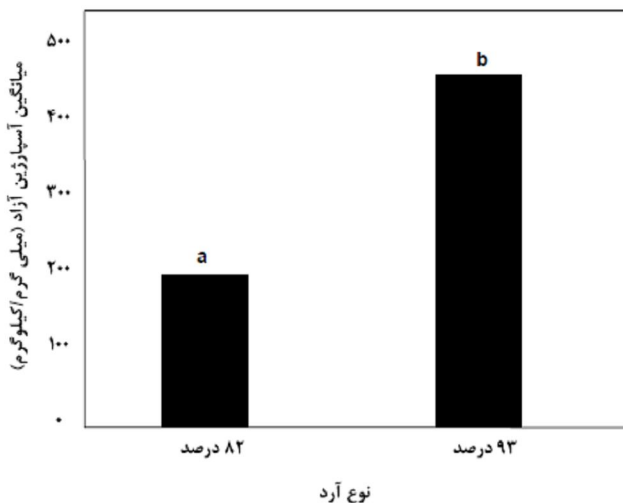
یافته‌ها

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



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

در نمودار 2 تأثیر درجه استخراج بر میزان آسپارژین آزاد مشاهده می‌شود (n=12).



نمودار 2: نمایش تأثیر درجه استخراج آرد بر میزان آسپارژین. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها است ($p < 0/05$).

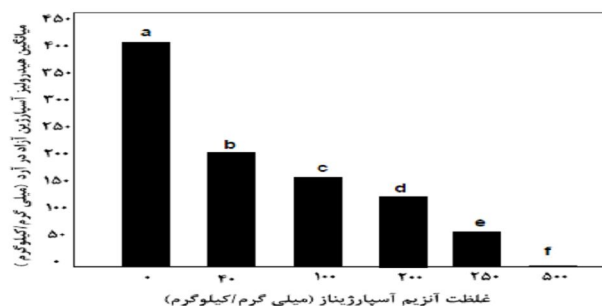
نتایج حاصل از اندازه‌گیری خاکستر در دو نوع آرد نشان داد که، بین میانگین مقدار خاکستر آرد 82 درصد به میزان (0/7 درصد) و خاکستر آرد 93 درصد به میزان (1/4 درصد) تفاوت معنی داری وجود دارد ($p < 0/05$).

های اختلاط اولیه 10 دقیقه، ثانویه 5 دقیقه، مقدار مخمر و زمان تخمیر 110 دقیقه) 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 نانوائی سنگگی 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 اندازه‌گیری آسپارژین آزاد انتخاب شد. 6- اندازه‌گیری آسپارژین آزاد در نمونه‌های خمیر: ابتدا نمونه‌های خمیر با سیستم خشک کن انجمادی، رطوبت زدایی شدند، سپس 0/1 گرم از هر کدام از نمونه‌ها به آرد تبدیل شد، و بعد از انتقال به لوله فالكون 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 نمونه‌های حاصل از استخراج مدت 10 دقیقه با 3500 دور/ دقیقه سانتریفوژ شدند، سپس برای مشتق سازی نمونه، 25 میکرولیتر از محلول حاصل از استخراج و استاندارد‌های مورد استفاده را به میکروتیوب 1/5 میلی لیتری منتقل و 300 میکرولیتر از محلول رسوب دهنده به آن افزوده شد، بعد از 30 ثانیه ورتکس، 10 دقیقه در 11000 دور/ 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، 10 میکرولیتر از هر کدام از نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری آسپارژین آزاد به دستگاه HPLC تزریق شد (21). 7- نتایج با نرم افزار SPSS نسخه 18 و تحلیل داده‌ها با آزمون‌های تی مستقل و من ویتنی انجام شد.

بحث

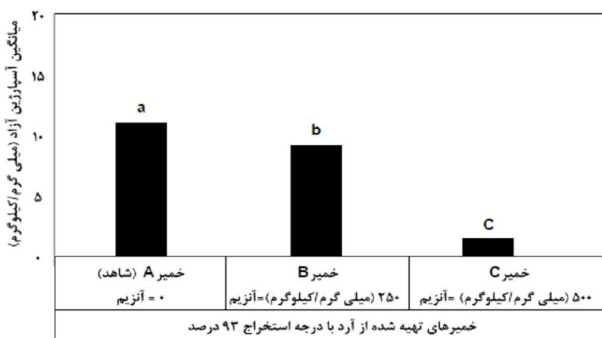
در شرایط آزمایشگاه تأثیر آنزیم بر هیدرولیز آسپارژین خالص به صورت صددرصد مشاهده شد، اما اثر غلظت موثر آنزیم بر هیدرولیز آسپارژین در آرد 93 درصد و خمیرهای ورنیامده تهیه شده از همین نوع آرد، در غلظت های مختلف، در دامنه 250 تا 500 میلی گرم/کیلوگرم مشاهده شد. اما تأثیر آنزیم روی آسپارژین خمیر در صنعت نانویی، 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 آمین، مبنی بر کاهش 75 درصدی آسپارژین در خمیر و نان زنجبیلی توسط آنزیم آسپارژیناز (23) و مطالعه وس مبنی بر کاهش 70-98 درصدی آسپارژین در کراکهای 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 اسیدهای آمینه آزاد، میزان آسپارژین آزاد را تا بیش از 90 درصد کاهش دهد (22) و با نتیجه تحقیقات ادواردو، مبنی بر تأثیر 88 درصدی آسپارژیناز بر هیدرولیز آسپارژین، بدون تأثیر 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 تأثیر بر رنگ نهایی محصول، همسوئی دارد (13). پژوهش حاضر نشان داد، زمانی که از غلظت برابر آنزیم 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 75/46-80/02 درصد کاهش یافت. مهم تر اینکه نسبت کاهش آسپارژین (آسپارژین هیدرولیز نشده) در هر دو نوع خمیر تهیه شده (با

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



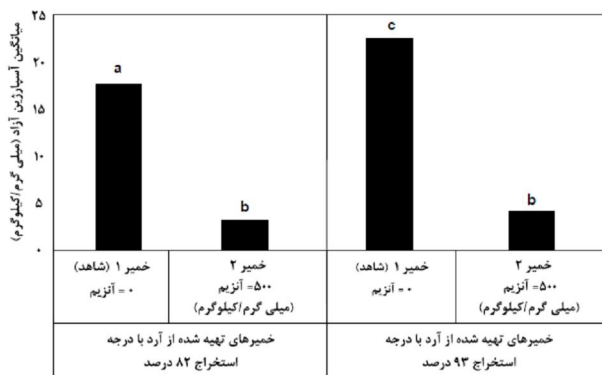
نمودار 3: نمایش تأثیر آنزیم آسپارژیناز بر هیدرولیز آسپارژین آرد در شرایط آزمایشگاه، حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها است (p<0/05).

در نمودار 4 تأثیر سطوح مختلف آنزیم آسپارژیناز بر هیدرولیز آسپارژین آزاد در مقیاس صنعتی مشاهده می شود (n=18).



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

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



نمودار 5: نمایش تأثیر غلظت آنزیم آسپارژیناز بر هیدرولیز آسپارژین در شرایط نانویی، حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها است (p>0/05).

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 بر تاثیر 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 نانواپی 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 نهایتاً 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 سوپسترا، 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 غالباً شرایط مطلوب آزمایشگاهی در اندازه

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 34-90 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 آندوسپرم 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 نانواپی در مقایسه با آنزیم بر کاهش آسپارژین به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفته 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 افزایش 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 مستقیماً ساخت اکریلامید را در فرآورده های نانواپی تحت تأثیر قرار می دهد،

رابطه با آنزیم‌ها کمپانی‌های تولیدکننده موارد ذیل اعلام نمی‌کنند: نوع سوش، دستور ویژه غذایی میکرو اورگانیزم، درصد خالص آنزیم، نوع کاربرها و حامل‌های آنزیم و شرایط محیطی تولید آنزیم از جمله: 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، ارگان‌های دولتی و غیر دولتی و همه کسانی که به نحوی در انجام این تحقیق مؤثر بوده‌اند و دانشگاه تربیت مدرس به خاطر تامین بخشی از هزینه‌ها تشکر می‌شود.

References:

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Swenson K. Dietary intake of acryl amide in Sweden. *Food Chemist Toxicol* 2003; 41(11): 1581-1586.
- Claus A. Acryl amide in cereal products: a review. *J Cereal sci* 2008; 47(2): 118-133.
- Edoardo C. Effect of flour type on Maillard reaction and acryl amide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Res Intl* 2009; 42(9): 1295-1302.
- 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.
- Stadler R H, Blank I, Varga N. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002; 419(6906): 449-450.
- Springer M, Fischer T, Lehrack A, Freund W. Development of acryl amide in baked products. *Getride Mehl und Brot* 2003; 57(5): 274-278.
- Claus A. Influence of agronomic factors and extraction rate on the acryl amide contents in yeast-leavened breads. *J Food Chemist* 2006; 54(23): 9876-9886.
- Richmond P. Acrylamide in food. *Lancet* 2007; 361(2): 361-362.
- 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.
- 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.

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 acrylamide 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-MS methods for the analysis of acrylamide 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 acrylamide formation in biscuits. *Food Chemist* 2011; 126(2): 435-440.
21. Wang A, Lee S, Shuang M. HPLC studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese food. *J Microchem* 2008; 89(2): 90-97.
22. Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M. Acrylamide 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 acrylamide 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 agronomic approaches to decreasing acrylamide 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-fertiliser effects on grain composition, industrial quality and end-use in durum wheat. *J Cereal Sci* 2006; 44(1): 2-11.

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

Habib Vahedi¹, Mohammad Hossein Azizi², Farzad Kobarfard³, Mohsen Barzegar⁴
and Zohre Hamidi Esfahani⁴

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