**مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران**
**سال هفتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۶۰-۵۱**

# تأثیر درجه استخراج آرد، میزان آنزیم آسپارژیناز، دما و مدت زمان پخت بر تشکیل آکریلامید در نان سنگک

حبیب واحدی[۱]، محمدحسین عزیزی[۲]، فرزاد کبارفرد[۳]، محسن برزگر[۴]، زهره حمیدی اصفهانی[۴]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی تکنولوژی مواد غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس. پست الکترونیکی: azizit_M@modares.ac.ir
۳- دانشیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۷

## چکیده

**سابقه و هدف:** آکریلامید ماده‌ای سرطان‌زا است که در دمای بالاتر از ۱۲۰°C در مواد غذایی غنی از کربوهیدرات مانند نان سنگک تشکیل می‌شود. با توجه به اهمیت تغذیه‌ای این نان، هدف این پژوهش بررسی تأثیر درجه استخراج آرد، میزان آنزیم آسپارژیناز، دما، مدت زمان پخت و اثرات متقابل آن‌ها بر تشکیل آکریلامید در نان سنگک بود.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا سازوکارهای تأیید شده مؤثر بر تشکیل آکریلامید تعیین شد؛ شامل: آسپارژین آزاد، قندهای گلوکز، فروکتوز، مالتوز و ساکارز در دو نوع آرد با درجه استخراج ۹۳ و ۸۲ درصد و دو نوع خمیر تهیه شده از این آردها. سپس تأثیر درجه استخراج آرد، میزان آنزیم آسپارژیناز، دما، مدت زمان پخت و اثرات متقابل آن‌ها بر تشکیل آکریلامید در نان سنگک بررسی شد. میزان آکریلامید با دستگاه LC/MS/MS اندازه‌گیری شد. تحلیل داده‌ها با $SPSS_{۱۶}$، $Minitab_{۱۵}$ و آزمون فاکتوریل انجام گرفت.

**یافته‌ها:** بین میانگین قندها بجز ساکارز در دو نوع آرد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. بین میانگین آکریلامید تشکیل شدهٔ ناشی از اثرات عوامل اصلی (درجه استخراج آرد، آنزیم، دما و مدت زمان پخت) و اثرات متقابل عوامل دو، سه و چهارگانه اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۰۱$). حداکثر میزان آکریلامید تشکیل شده در ترکیب ۷۲ تیماری حاصل از اثرات متقابل عوامل چهارگانه در دمای ۳۵۲°C، مدت زمان پخت ۱۰ دقیقه و آرد با درجه استخراج ۹۳٪ (بدون آنزیم) به میزان ۶۰/۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، و حداقل میزان تشکیل آکریلامید در دمای ۲۴۱°C، مدت زمان پخت ۵ دقیقه و آرد با درجه استخراج ۸۲٪ (با آنزیم) به میزان ۱۳/۰۷ میلی‌گرم/کیلوگرم/ نان سنگک مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** با کاهش آسپارژین آزاد توسط آنزیم آسپارژیناز، گلوکز و فروکتوز عامل اصلی تشکیل آکریلامید در نان سنگک شناخته شدند. میزان تشکیل آکریلامید با افزایش درجه استخراج آرد افزایش یافت. این میزان با دما و مدت زمان پخت رابطه مستقیم داشت. میزان تشکیل آکریلامید در حضور آنزیم آسپارژیناز در پایین‌ترین حد مشاهده شد. آموزش به نانوایان به منظور عدم برشته کردن نان تا حد زیادی منجر به سلامت نان سنگک خواهد شد.

**واژگان کلیدی:** آسپارژین آزاد، آکریلامید، آنزیم آسپارژیناز، نان سنگک، LC/MS/MS

## • مقدمه

آکریلامید یک ترکیب بالقوه سرطان‌زا است که در بدن تجزیه می‌شود و متابولیتی به نام گلاسیدآمید تولید می‌کند. گلاسیدآمید با اثر بر DNA باعث ایجاد جهش در ژن‌ها و بروز سرطان می‌شود (۲، ۱). مطالعات انجام شده در سایر کشورها و پژوهش‌های مستقل انجام شده حاکی از این است که ارتباط معنی‌داری بین مصرف غذاهای حاوی آکریلامید و سرطان‌های روده بزرگ، مثانه، پانکراس، کلیه، دهان، حنجره، گلو، سینه، مری، تخمدان، پوست، ریه و ایجاد تومور وجود دارد (۲۱-۳).

اولین بار، آکریلامید در فراورده‌های غلات و سیب‌زمینی شناسایی شد. بعد از تأیید این یافته‌ها مشخص شد که آکریلامید در دمای بالاتر از ۱۲۰°C در فراورده‌های غنی از کربوهیدرات تشکیل می‌شود (۲۳، ۲۲). اولین مطالعه، سازوکار تشکیل آکریلامید را طی فرایندهای حرارتی بالا از طریق واکنش غیرآنزیمی میلارد ارائه کرد (۲۴). میزان

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12 ]

تولید آکریلامید به دو عامل ترکیب مواد غذایی و شرایط فراوری بستگی دارد (۲۵). میزان آکریلامید در محصولات نانوایی در محدوده بین ۳۰ تا ۵۰۰۰۰ میکروگرم/کیلوگرم است و بسته به میزان آغازگرها، دما، زمان پخت و سامانه انتقال حرارت تنور به ۱۰۰۰۰ میکروگرم/کیلوگرم و بالاتر نیز می‌رسد. آکریلامید در بیسکوئیت‌ها و کراکرها با توجه به فرمولاسیون ویژه این محصولات و شرایط پخت با محدوده دمایی ۱۸۰ -۴۰۰°C در دامنه وسیعی وجود دارد. بر اساس ارزیابی‌های متعدد نان، کراکر، کلوچه، بیسکوئیت و غلات صبحانه از منابع عمده رژیمی دریافت آکریلامید توسط انسان هستند (۲۶).

چون غلظت‌های کم این ماده نیز خطرآفرین است، هیچ حد ایمنی برای آن که از ایجاد سرطان جلوگیری کند، تعیین نشده است (۲۳). سازمان جهانی بهداشت متوسط دریافت مجاز آکریلامید را از طریق مواد غذایی در سطح ملی ۰/۲ تا ۰/۳ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز اعلام کرده است (۲۷، ۲۴). نان سنگک از آردهایی با درجه استخراج بالا (حاوی خاکستر و سبوس بیشتر) تهیه می‌شود درجه استخراج آرد که با مقدار خاکستر (مرتبط‌ترین عامل با تولید آکریلامید) نشان داده می‌شود، بر میزان تشکیل آکریلامید در نان اثر مستقیم دارد (۲۹، ۲۸). طی مطالعه‌ای روی ویفر مشخص شد هنگامی که از آرد با خاکستر ۱/۰۵درصد به جای ۰/۵۵ درصد استفاده شود، مقدار تشکیل آکریلامید به ۲ برابر افزایش می‌یابد. علت این افزایش را به زیادتر بودن قند احیاءکننده و آسپارژین آزاد در آرد با خاکستر بالا نسبت داده‌اند. میزان تشکیل آکریلامید در نان با غلظت پیش‌سازهای موجود در آرد رابطه مستقیم دارد (۲۸، ۲۶).

از آن جا که با هر میزان آکریلامید خطر ابتلا به سرطان در انسان افزایش می‌یابد، لذا انجام تحقیقات در جهت کاهش دریافت آن بسیار مهم است. با توجه به فراهم بودن سازوکارهای تشکیل آکریلامید در نان سنگک و عدم انجام تحقیقات گسترده در کشور و اهمیت غذایی این نوع نان در برنامه غذایی مردم ایران، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر برخی عوامل بر میزان تشکیل آکریلامید در نان سنگک و اندازه‌گیری آکریلامید با دستگاه کروماتوگرافی مایع - طیف سنجی جرمی متوالی (LC/MS/MS) برای اولین بار در ایران، در *دانشگاه تربیت مدرس* طی سال‌های ۹۰ - ۸۷ طراحی و انجام شد.

## • مواد و روش‌ها

جهت انجام این تحقیق تجربی دو رقم گندم از استان گلستان تهیه شد. از مخلوط کردن گندم‌ها به نسبت مساوی دو نوع آرد با درجه استخراج ۹۳ و ۸۲ درصد جهت تهیه دو نوع خمیر تولید شد. آنزیم آسپارژیناز محصول شرکت میلبو (ایتالیا)، نمک طعام بدون ید محصول *کارخانه نمک هدیه* و مخمر نانوایی *ساکارومایسس سرویزیه* محصول *شرکت ایران ملاس* تهیه شدند (۳۰). استاندارد آکریلامید با خلوص بالای ۹۹/۵ درصد، استاندارد داخلی آکریلامید ($d_3$- آکریلامید) با خلوص بیش از ۹۸ درصد، استونیتریل، استاندارد قندها ، ترموکوپل مدل 925-8168/Tm L090 و حسگر فلکسی ۳ متری به ترتیب از شرکت‌های *سیگما آلدریچ* (تایوان) و *Merck* (آلمان) و *شرکت سنجش صنعت* (ایران) تهیه شدند. در این تحقیق ابتدا میزان استفاده از آنزیم آسپارژیناز بر کاهش آسپارژین آزاد در خمیر نان بررسی شد (۳۰). سپس قندهای گلوکز، فروکتوز، مالتوز و ساکارز (قبل از تخمیر) در دو نوع آرد توسط ستون استخراج فاز جامد SPE ( Solid Phase Extraction) استخراج شد و با دستگاه HPLC (۳۲،۳۱) ، به این شرح اندازه‌گیری شد: تعداد ۴۸ نمونه از دو نوع آرد تهیه شد (۲۵). هر کدام از نمونه‌ها در چنین شرایطی آماده شد: ۵ گرم آرد + cc ۱۰۰ آب مقطر + '۳۰ شیکر + '۲۰ استراحت + '۲۰ اولتراسونیک در دمای محیط + '۲۰ استراحت. از فاز صاف شدهٔ بالایی هر نمونه ۵۰cc جدا شد. استخراج و تغلیظ قندها توسط SPE با این تنظیمات انجام شد: ستون C18، حجم cc ۵، طول ۲۵۰mm، قطر ۴/۶mm و ضخامت بستر ۴mm ، ذرات پرکننده به قطر ۵ میکرون (محصول شرکت Waters، امریکا) و پمپ خلأ (مدل40V-EP محصول شرکت Rohs، آلمان). با پیپت پاستور ۲cc از هر مرحله شست و شو برای هر نمونه جمع‌آوری شد، و توسط صافی سر سرنگی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون صاف شد. میزان قندها توسط دستگاه HPLC، (مدل Agilent/2695/Series ، آمریکا) با این تنظیمات اندازه‌گیری شد: آشکارساز ضریب شکست (RI)، فاز متحرک (۷۵٪ استونیتریل + ۲۵٪ آب دو بار تقطیر)، ستون $C_{18}$ ، طول ۲۵۰mm و قطر ۴/۶mm میلی‌متر و ذرات پرکننده به قطر ۵ میکرون (محصول شرکت Waters)، سرعت فاز متحرک ۰/۶ میلی‌لیتر/ دقیقه، حجم تزریق ۴۰ میکرولیتر، دمای فاز متحرک ۴۵°C، فشار ۴۰۰psi - ۳۹۸. استفاده از مدل‌های برازش روش اندازه‌گیری قندها به این

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12 ]

ترتیب بود: فروکتوز ppm ۲۰- ۴ = LR , n=۵ ، ۰/۹۹۹۸= $R^2$ ، $y = ۴۵۱۸/۱x + ۵۸۶/۲۷$ ، ساکارز ppm ۴۰- ۸ = LR , n=۵ ، ۰/۹۹۹۹= $R^2$ ، $y = ۹۱۶۵/۴x + ۱۹۴۲/۲$ ، گلوکز ppm ۲۰- ۴ = LR , n=۵ ، ۰/۹۹۹۹= $R^2$ ، $y = ۷۷۶/۲x - ۴۸۴۶/۳$ ، مالتوز ppm ۴۰- ۸ = LR , n=۵ ، ۰/۹۹۹۹= $R^2$ ، $y = ۸۲۹۳/۸x + ۱۹۴۵/۶$ (شکل ۱).

نتایج حاصل در دامنه $0 < R^2 < 1$ بیانگر خطی بودن منحنی‌ها در محدوده ۴ - ۲۰ و ۸ - ۴۰ میلی‌گرم در لیتر بود. جهت بررسی صحت و دقت روش، نمونه‌های کنترلی از ۴ نوع قند ساخته شد (به ازای هر ۱۰ تزریق یک نمونه کنترلی) و پس از طی مراحل استخراج با SPE مطابق نمونه‌ها و استانداردها به دستگاه تزریق شد. نتایج به دست آمده و نزدیک بودن جواب‌های نمونه‌های کنترلی بیانگر صحت روش و انحراف استاندارد نسبی (RSD) کمتر از ۲٪ تأییدکننده دقت روش بود. جهت تعیین کارآیی ستون SPE مقدار cc ۲ از محلول زیر کارتریج برداشته شد و با عبور دادن از صافی سر سرنگی، میزان ۴۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد. نتایج حاصل، استخراج قندها را در دامنه ۹۷/۶ تا ۱۰۰ درصد از هر دو نوع آرد تأیید کرد.

**اندازه‌گیری قندها بعد از تخمیر** (۳۲): ابتدا ۴۸ نمونه خمیر به طور تصادفی انتخاب شد و توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی در شرایط (خلأ کمتر از یک بار، دما ۴۰°C- و زمان ۱۲ ساعت) خشک شد. سپس با آسیاب آرد شد و ۱ گرم از نمونه آرد شده به لوله فالکون cc ۱۵ منتقل شد. به آن cc۱۰ از محلول اتانول ۶۰٪ افزوده شد. درِ لوله کاملا بسته و '۲۰ در دمای ۱۰۰°C قرار داده شد. بعد از خنک شدن در دمای اتاق با کاغذ صافی واتمن صاف شد. بعد از استخراج و تغلیظ توسط ستون SPE، مقادیر قندها توسط دستگاه HPLC/RI تعیین شد (شکل ۲).

**تهیه خمیر نان سنگک:** دو نوع آرد با درجه استخراج ۸۲ و ۹۳ درصد (از هر کدام ۱۰۰ کیلوگرم) تهیه شد. دو نوع خمیر با آنزیم و بدون آنزیم بر اساس فرمولاسیون تهیه نان سنگک بر مبنای وزن آرد به ازای هر ۱۰۰ گرم آرد؛ مخمر ۰/۵ درصد، آب ۸۵ درصد و نمک ۱ درصد تهیه شد (۳۳). آنزیم با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در فاز آبی قبل از اضافه کردن مواد خشک کاملا حل شد (۳۴، ۳۰). مقدار آرد، زمان‌های اختلا ط اولیه '۱۰، ثانویه' ۵ و زمان تخمیر '۱۱۰ برای تهیه هر دو نوع خمیر ثابت نگه داشته شد.

**پخت نان:** در هر سری پخت ۱۴ عدد نان در ۳ ردیف به این ترتیب داخل تنور قرار گرفت: ردیف اول ۵ تایی، بیشترین فاصله از مشعل و با دماهای پخت °C ۳۵۲ ، °C ۳۳۳ و °C ۳۲۶ ؛ ردیف دوم وسط تنور، ۵ تایی و با دماهای پخت °C ۳۱۹ ،°C ۳۱۴ و °C ۳۰۹، ردیف سوم مجاور مشعل حرارتی، ۴ تایی و با دماهای پخت °C ۳۰۳ ، °C ۲۹۰ و °C ۲۴۱. این خمیرها مطابق روش رایج نانوایی سنگکی در زمان‌های' ۵ (پخت معمولی) و '۱۰(برشته شدن) ضمن ثبت درجه حرارت پخت توسط ترموکوپل پخته شدند. انتخاب نمونه‌های نان به صورت قرعه‌کشی از هر ردیف ۳ عدد نان (از هر سری پخت ۹ عدد نان) و جمعاً ۷۲ نمونه نان انتخاب (۲۴) و در دمای کمتر از °C ۵۰ خشک شد. نان‌ها با آسیاب به ذرات کوچک‌تر از ۱۰۰۰ میکرون (۳۵) خرد شدند. نمونه‌های آزمایشگاهی با استفاده از فرایند ربع کردن، به وزن ۱۵۰ گرم تهیه شدند، و در دمای کمتر از صفر درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج آکریلامید نگهداری شدند. انجام مراحل تکوین و معتبرسازی روش اندازه‌گیری آکریلامید در *گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی* انجام شد. برای تعیین میزان آکریلامید از استاندارد داخلی آکریلامید ($d_3$ ـ آکریلامید) به منظور حذف خطاهای حاصل از استخراج، حجم تزریق و فرونشانی یون (ionsuppression) استفاده شد. محلول‌های استاندارد (محلول‌های مادر آکریلامید و $d_3$ ـ آکریلامید) در آب مقطر با غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر تهیه شد. جهت معتبر سازی روش، محلول‌های استاندارد آکریلامید با غلظت‌های ۵ ، ۱۰ ، ۵۰ ، ۱۰۰ ، ۲۰۰ ، ۴۰۰ ، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر تهیه شد. به طوری که همه محلول‌های استاندارد حاوی ۲۵۰ میکروگرم $d_3$ ـ آکریلامید در هر میلی‌لیتر به عنوان استاندارد داخلی بودند. پس از تزریق نمونه‌های استاندارد به دستگاه و محاسبه نسبت سطح زیر منحنی پیک آکریلامید به سطح زیر منحنی پیک $d_3$ ـ آکریلامید منحنی کالیبراسیون رسم شد. نتایج حاصل بیانگر خطی بودن منحنی در محدوده غلظت‌های ۵ تا ۱۶۰۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر بود. مدل برازش روش عبارت بود از: (ppb ۱۶۰۰– ۵) و $R^2$ =۰/۹۹۹۹ و $y = ۰/۰۰۰۱x + ۰/۰۰۰۷$.

جهت بررسی دقت و صحت روش در طول یک روز ۳ غلظت ۵ ، ۵۰۰ و ۱۲۰۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر آکریلامید در آب مقطر تهیه شد. هر غلظت ۵ بار در زمان‌های مختلف در طول یک روز به دستگاه تزریق شد. دقت روش به صورت

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12 ]

انحراف معیار نسبی (RSD) و صحت به صورت درصد غلظت اندازه‌گیری شده به غلظت واقعی محاسبه شد. بر این اساس، دقت درون روزی ۲/۶۸ تا ۵/۷۵ درصد، دقت بین روزی ۳/۰۸ تا ۶/۲۷ درصد و صحت معادل ۱۰۱/۵ تا ۹۸ درصد محاسبه شد. کمترین حد قابل اندازه‌گیری Limit of LOQ (Quantification) ۵ نانوگرم/میلی‌لیتر و کمترین حد آشکارسازی LOD (Limit of Detection) ۱/۵ نانوگرم/میلی‌لیتر بود.

**استخراج آکریلامید**: ۱۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه نان بعد از همگن کردن، با ۲۵۰ میکرولیتر استاندارد داخلی آکریلامید و ۵cc آب مقطر دیونیزه شده مخلوط و به داخل لوله فالکون ۱۵cc منتقل شد. سوسپانسیون تشکیل شده در دمای معمولی '۲ تحت لرزش مغناطیسی ورتکس شد و با سرعت (rpm)۵۵۰۰ به مدت '۱۰ سانتریفوژ شد. توسط سمپلر ۲cc از فاز صاف شده بالایی برداشته شد، با عبور از صافی سر سرنگی به ظرف مخصوص منتقل شد و میزان آکریلامید توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع - طیف سنجی جرمی متوالی LC/MS/MS (Liquid chromatography tandem mass spectrometry) مدل Agilent/4610/USA (۳۷، ۳۶)، با تنظیماتی که در جدول ۱ آمده است و با استفاده از روش ثبت واکنش چندگانه در مد مثبت اندازه‌گیری شد.

محاسبه میزان آکریلامید با استفاده از روش MRM (Multiple Reaction Monitoring) و الگوی تجزیه‌ای m/z [55 < 72 (آکریلامید)] و استاندارد داخلی [58 < 75 m/z ($d_3$-آکریلامید)] انجام شد. از تقسیم نسبت سطح زیر منحنی پیک آکریلامید نمونه به سطح زیر منحنی استاندارد داخلی آکریلامید، مقدار آکریلامید در هر نمونه نان محاسبه شد. تحلیل نتایج با نرم‌افزارهای SPSS ۱۶، Minitab ۱۵ و آزمون فاکتوریل انجام گرفت.

**جدول ۱. تنظیمات دستگاه کروماتوگرافی مایع - طیف سنجی جرمی متوالی**

| | |
|---|---|
| روش کار: حلال ثابت، فاز: معکوس<br>pH=۲/۵، زمان بازداری: ۷ - ۶/۵ دقیقه<br>سامانه: الکترواسپری در حالت پایش یون‌های مثبت (MRM )<br>سرعت گاز خشک کننده: ۶ لیتر/دقیقه<br>فشار اسپری کننده در پاشنده: ۵۰psi<br>ولتاژ کاپیلر: ۲۵۰۰ ولت، ولتاژ تصادم: ۵ ولت | سرعت فاز متحرک: ۰/۵ میلی لیتر/ دقیقه<br>فاز متحرک: ۹۷ ٪ آب + ۳ ٪ استونیتریل<br>دمای ستون: ۳۰°C<br>ولتاژ جزء به جزء سازی: ۸۰ ولت |
| تجزیه‌گر جرمی: چهار قطبی سه گانه | درجه حرارت تجزیه گرها : ۱۰۰ °C |
| آشکار ساز: الکترون مولتی‌پلایر<br>درجه حرارت گاز خشک‌کننده: ۳۰۰ °C | ستون: (Zorbax,$C_{18}$ ، قطر ذرات پرکننده ۵ میکرومتر، طول ۱۵۰mmو قطر داخلی ۴/۶ mm) |
| حجم تزریق: ۳۰ میکرولیتر | نرم افزار کنترل‌کننده: مس هانتر |

## • یافته‌ها

نتایج اندازه‌گیری قندها قبل از تخمیر (شکل ۱) و بعد از تخمیر (شکل ۲) نشان داده شده است. نتایج اثرات دما، درجه استخراج آرد، زمان پخت و آنزیم آسپارژیناز بر تشکیل آکریلامید در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، بین میانگین‌های آکریلامید تشکیل شدهٔ حاصل از اثرات عوامل اصلی و اثرات متقابل عوامل دوگانه، سه گانه و چهارگانه اختلاف معنی‌داری وجود دارد. زمانی که اثرات متقابل عوامل چهارگانه معنی‌دار می‌شود، هر چهار حالت باید در مدل نگه داشته شوند؛ حتی اگر معنی‌دار نباشند. نکته قابل توجه این است که نشان دادن ترکیب ۷۲ تیماری بر روی یک شکل مسیر نیست. ولی مقایسه‌های دو به دو حاصل از این ۷۲ ترکیب تیماری (۲۵۵۶ مقایسه دو به دو) مشخص کرد که همه این ترکیبات تیماری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند.

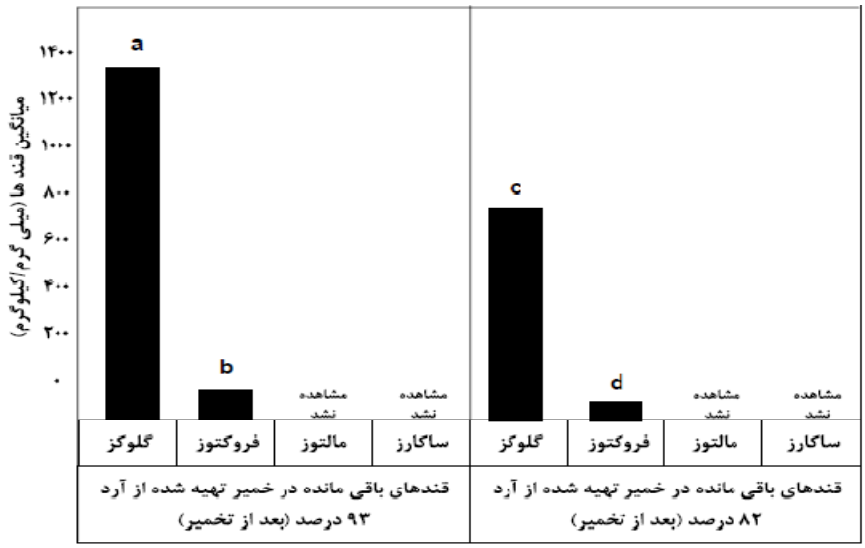
شکل ۵ بیانگر تشکیل حداکثر و حداقل میزان آکریلامید در ترکیب ۷۲ تیماری حاصل از اثرات متقابل عوامل چهارگانه در هر کیلوگرم نان سنگک است.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12 ]



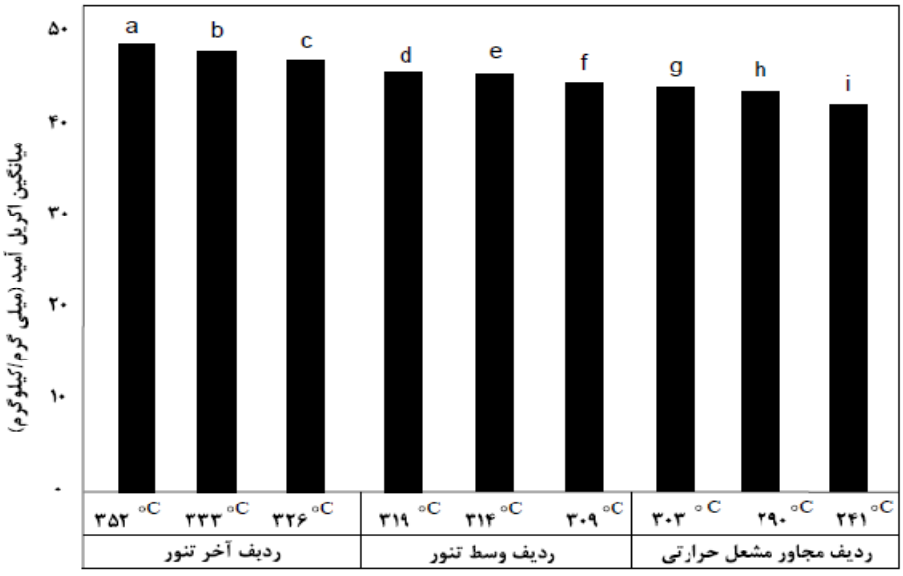

**شکل ۱. نمودار نمایش قندها، قبل از تخمیر**

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است




**شکل ۲. نمودار نمایش میزان قندها بعد از تخمیر**

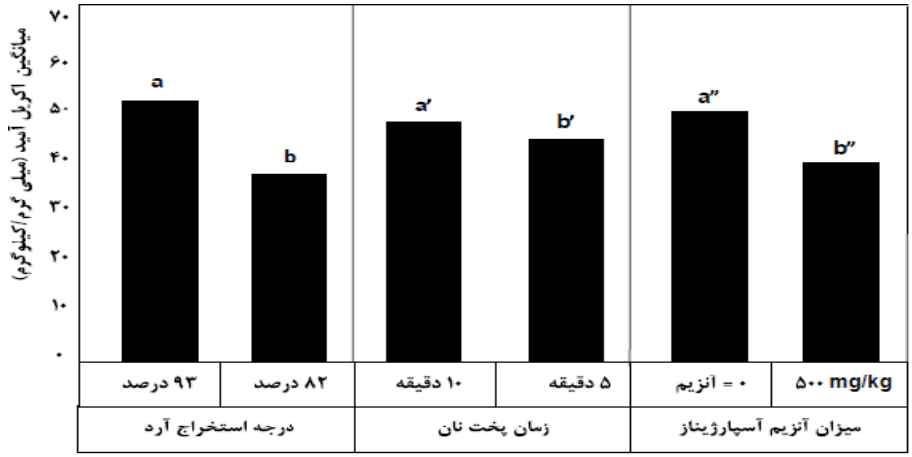
حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است




**شکل ۳. نمودار نمایش تأثیر دمای پخت بر میزان تشکیل آکریلامید در نان سنگک**

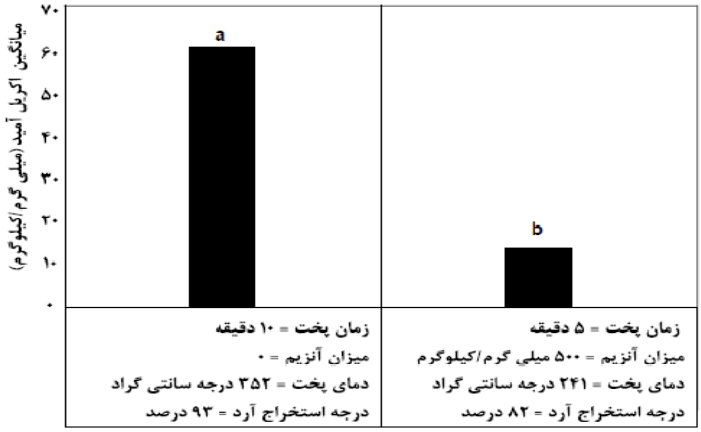
حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12 ]




**شکل ۴. نمودار نمایش تأثیر آنزیم آسپارژیناز، زمان پخت و درجه استخراج آرد بر تشکیل آکریلامید در نان سنگک**

حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است




**شکل ۵. نمودار نمایش تأثیر اثرات متقابل عوامل چهارگانه بر میزان ساخت آکریلامید در نان سنگک**

حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است

**جدول ۲ . تحلیل واریانس آکریلامید با استفاده از مجموع مربعات تصحیح شده برای آزمون‌ها**

| اثرات | منبع تغییرات | درجه آزادی | مجموع مربعات | مجموع مربعات تصحیح شده | میانگین مربعات تصحیح شده | F | p-Value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | دما(A) | ۸ | ۷۴۸/۵۷ | ۷۴۸/۵۷ | ۹۳/۵۷ | ۹۳۵۷۰۸/۱۷ | ۰/۰۰۰ |
| | درجه استخراج(B) | ۱ | ۱۶۱۶۷/۸۹ | ۱۶۱۶۷/۸۹ | ۱۶۱۶۷/۸۹ | ۱۶۱۶۷۸۹۰۰ | ۰/۰۰۰ |
| اصلی | آنزیم(C) | ۱ | ۶۷۱۸/۱۰ | ۶۷۱۸/۱۰ | ۶۷۱۸/۱۰ | ۶۷۱۸۰۹۸۸/۱۷ | ۰/۰۰۰ |
| | زمان پخت(D) | ۱ | ۱۸۰۷/۵۲ | ۱۸۰۷/۵۲ | ۱۸۰۷/۵۲ | ۸۰۷۵۲۳۲/۶۷ | ۰/۰۰۰ |
| | A.B | ۸ | ۱۸۴/۹۵ | ۱۸۴/۹۵ | ۲۳/۱۲ | ۲۳۱۱۸۲/۴۴ | ۰/۰۰۰ |
| | A.C | ۸ | ۱۳/۱۶ | ۱۳/۱۶ | ۱/۶۴ | ۱۶۴۴۸/۹۲ | ۰/۰۰۰ |
| متقابل | A.D | ۸ | ۱۶/۱۶ | ۱۶/۱۶ | ۲/۰۲ | ۲۰۱۹۴/۸۵ | ۰/۰۰۰ |
| دوگانه | B.C | ۱ | ۲۲۴۴/۶۰ | ۲۲۴۴/۶۰ | ۲۲۴۴/۶۰ | ۲۲۴۴۶۰۰۴/۱۷ | ۰/۰۰۰ |
| | B.D | ۱ | ۳۶۶/۲۹ | ۳۶۶/۲۹ | ۳۶۶/۲۹ | ۳۶۶۲۸۹۰/۶۷ | ۰/۰۰۰ |
| | C.D | ۱ | ۰/۲۱ | ۰/۲۱ | ۰/۲۱ | ۲۱۲۸/۱۷ | ۰/۰۰۰ |
| | A.B.C | ۸ | ۱۰۸/۲۴ | ۱۰۸/۲۴ | ۱۳/۵۳ | ۱۳۵۳۰۶/۲۳ | ۰/۰۰۰ |
| متقابل | A.B.D | ۸ | ۹۹/۷۴ | ۹۹/۷۴ | ۱۲/۴۷ | ۱۲۴۶۸۰/۱۷ | ۰/۰۰۰ |
| سه‌گانه | A.C.D | ۸ | ۱۴/۰۷ | ۱۴/۰۷ | ۱/۷۶ | ۱۷۵۸۵/۸۵ | ۰/۰۰۰ |
| | B.C.D | ۱ | ۱۰۰/۴۵ | ۱۰۰/۴۵ | ۱۰۰/۴۵ | ۱۰۰۴۵۰۴/۱۷ | ۰/۰۰۰ |
| متقابل چهارگانه | A.B.C.D | ۸ | ۳۹/۳۵ | ۳۹/۳۵ | ۴/۹۲ | ۴۹۱۹۱/۲۹ | ۰/۰۰۰ |
| | خطا | ۱۴۴ | ۰/۰۱ | ۰/۰۱ | ۰/۰۰۰ | | |
| | کل | ۲۱۵ | ۲۸۶۲۹/۳۲ | | | | |

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12 ]

## • بحث

اولین یافته تحقیق، بیانگر تأثیر درجه استخراج آرد بر میزان قندهاست. به طوری که تغییر درجه استخراج آرد از ۸۲ به ۹۳ درصد باعث افزایش ساکارز ۵/۱۰ درصد، مالتوز ۱۲۷/۴۳ درصد، گلوکز ۳۴۳/۸۹ درصد و فروکتوز ۳۴۷/۰۷ درصد شد. این نتیجه با نتایج مطالعه *Claus* (۲۸، ۲۶) بر روی ویفر مطابقت دارد که با افزایش درجه استخراج آرد، میزان تشکیل آکریلامید افزایش یافت.

دومین یافته قابل توجه در این پژوهش، مشخص شدن نقش قندهای احیاءکننده در ساخت آکریلامید در حضور مقدار بسیار کم آسپارژین آزاد در نان سنگک بود (مطالعات قبلی آسپارژین آزاد را به عنوان عامل محدودکننده تشکیل آکریلامید در فراورده‌های غلات اعلام کرده بودند). در تحقیق حاضر، آسپارژین آزاد در خمیرها توسط آنزیم آسپارژیناز به مقادیر بسیار پایین و بی اثر بر تولید آکریلامید کاهش داده شد (۳۰) اما با کمال تعجب آکریلامید ساخته شد. با ساخته شدن آکریلامید در حضور مقدار بسیار ناچیز آسپارژین آزاد، نقش قندهای احیاءکننده در تشکیل آکریلامید در نان پر رنگ شد. این موضوع نشان داد که قندها از نقطه نظر تشکیل آکریلامید مهم‌ترین عامل در تولید میزان آکریلامید هستند. این نقش ویژه قندها در خمیرهای تهیه شده از آرد ۹۳ درصد که حاوی ۶۸/۷۱ درصد گلوکز بیشتر نسبت به خمیر تهیه شده از آرد ۸۲ درصد بود، مشخص شد. با افزایش درجه استخراج از ۸۲ به ۹۳ درصد، میانگین آکریلامید تشکیل شده در نان ۵۰/۳۳ درصد افزایش یافت. این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعات *Yaylayen* (۳۸) مطابقت دارد که عامل مهم و تعیین‌کننده ساخت آکریلامید در حضور مقدار کم آسپارژین (همانند تحقیق حاضر)، گلوکز است، و با هر مقدار آسپارژین در حضور قند گلوکز، آکریلامید با مقدار بالا ساخته خواهد شد. اما با برخی نتایج تحقیق *Springer* (۲۹) همخوانی ندارد که آسپارژین آزاد را به عنوان عامل کلیدی برای تشکیل آکریلامید در نان معرفی کرده است. وی نقش قندها را در حضور مقدار کم آسپارژین، شرایط پخت و تأثیر درجه استخراج را روی تشکیل آکریلامید بررسی نکرد. ولی با نتایج مطالعات *Claus* روی ویفر (۲۸، ۲۶) و برخی نتایج مطالعات *Springer* (۲۹) و *Claus* (۲۸) روی آرد چاودار و گندم که با افزایش درجه استخراج، میزان خاکستر آرد افزایش یافت، همسو است. به علاوه، با نتایج بررسی‌های انجام شده توسط محققان پژوهش حاضر (۳۰) مبنی بر این که افزایش درجه استخراج آرد باعث افزایش میزان خاکستر آرد و متعاقبا افزایش قندهای احیاءکننده می‌شودو تحقیق‌های *Hansen* (۳۹) مبنی بر این که میزان خاکستر آرد، مرتبط‌ترین عامل کلیدی است که مستقیما ساخت آکریلامید را در فراورده‌های نانوایی تحت تأثیر قرار می‌دهند، همسو است.

سومین یافته، تأثیر دما بر تشکیل آکریلامید بود. با افزایش دما از $241\ ^{\circ}C$ (کمترین دمای پخت)، به $352\ ^{\circ}C$ (بیشترین دمای پخت) میانگین تشکیل آکریلامید به میزان ۱۴/۳۵ درصد افزایش یافت (تحقیق مشابهی برای مقایسه یافت نشد).

چهارمین یافته، بیانگر تأثیر مدت زمان پخت بر تشکیل آکریلامید است، با افزایش زمان پخت از ۵′ به ۱۰′ میانگین تشکیل آکریلامید به میزان ۱۴/۴۰ درصد افزایش یافت (تحقیق مشابهی جهت مقایسه یافت نشد).

پنجمین یافته تحقیق، استفاده از آنزیم آسپارژیناز به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (۳۰) باعث شد تا میانگین تشکیل آکریلامید در نان سنگک به میزان ۲۲/۹۶ درصد کاهش یابد. این نتیجه با نتایج پژوهش‌های *Claus* (۲۶) مبنی بر این که آنزیم آسپارژیناز می‌تواند باعث کاهش تولید آکریلامید تا سطح ۷۰ درصد در فرآورده‌های غلات بدون تأثیر بر رنگ و طعم محصول شود و با نتایج تحقیقات *Edeardo* (۲۴) مبنی بر کاهش ۸۸ درصدی آکریلامید در نان چاودار (بدون تأثیر بر تشدید تولید هیدروکسی متیل فورفورال و فرایند فعالیت آنتی اکسیدانی) و با نتایج مطالعات *Haune* (۴۰) مبنی بر کاهش ۳۴ تا ۹۰ درصدی آکریلامید در بیسکوییت‌های نیمه شیرین، نان زنجبیلی و نان ترد همسویی دارد. تفاوت‌های ناشی از بازدهی آنزیم آسپارژیناز به نوع سامانه تهیه نان برمی‌گردد. پژوهش‌های انجام شده در جهان مبتنی بر استفاده از آنزیم آسپارژیناز در جهت کاهش آکریلامید در فرآورده‌های غلات بجز در مورد بیسکوئیت‌های نیمه شیرین در سامانه‌های مدل و شرایط ازمایشگاهی و با مداخله انجام شده است، اما تحقیق حاضر در مقیاس صنعتی بدون هیچ‌گونه مداخله در فناوری نانوایی سنگکی انجام شد. مسلماً شرایط مطلوب آزمایشگاهی در مقیاس صنعتی به ندرت محقق می‌شود.

ششمین یافته بیانگر این است که با حضور آنزیم آسپارژیناز، میزان تولید آکریلامید کاهش می‌یابد؛ هر چند

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12 ]

که درجه استخراج، مدت زمان پخت و دما نیز تأثیرگذار است. با کاهش درجه استخراج، دما و مدت زمان پخت میزان آکریلامید تولید شده بیشتر کاهش می‌یابد (تحقیقی جهت مقایسه یافت نشد). نتایج مطالعه نشان داد که با افزایش درجه استخراج آرد، دما، زمان پخت و افزایش فاصله نان از مشعل میزان تشکیل آکریلامید در نان سنگک افزایش می‌یابد. این میزان با دما و زمان پخت رابطه مستقیم دارد. با کاهش آسپارژین آزاد توسط آنزیم، قندها مهمترین عامل تشکیل آکریلامید در نان سنگک هستند. حداکثر میزان آکریلامید تشکیل شده در ترکیب ۷۲ تیماری حاصل از اثرات متقابل عوامل چهارگانه در دمای ۳۵۲°C، مدت زمان پخت '۱۰ و آرد با درجه استخراج ۹۳ درصد (بدون آنزیم) به میزان ۶۰/۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و حداقل میزان تشکیل آکریلامید در دمای ۲۴۱ °C، مدت زمان پخت '۵ و آرد با درجه استخراج ۸۲ درصد (با آنزیم) به میزان ۱۳/۰۷ میلی‌گرم/کیلوگرم/ نان سنگک مشاهده شد. با توجه به نتایج و یافته‌های مفید حاصل از آنزیم آسپارژیناز به نظر می‌رسد که استفاده از آنزیم آسپارژیناز، کاهش قندهای احیاءکننده، دمای پایین و برشته نکردن نان می‌تواند در کاهش ساخت آکریلامید و بهبود سلامت نان سنگک بسیار مؤثر باشد. از محدودیت‌های مهمِ اندازه‌گیری آکریلامید، هزینه بالا و کم بودن دستگاه LC/MS/MS در ایران و دسترسی بسیار محدود محققان این وسیله است.

**سپاسگزاری**

این مقاله حاصل رساله دکترای تخصصی تکنولوژی مواد غذایی می‌باشد که به تصویب *شورای پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس* رسیده و به شماره ۸۲/۴۰۰۲ ثبت شده است. از کلیه استادان، سازمان‌های دولتی و غیر دولتی و *دانشگاه تربیت مدرس* به خاطر تأمین بخشی از هزینه‌ها تشکر می‌شود.

## • References

1. Internationl Agency for Research on Cancer (IARC). Some industrial chemicals, Lyon: IRAC Monographs on the evalution for carcinogenic risk of Chemical to humans 1994; 60(13): 435-53.
2. Vasper H. Cross - Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. J Agri Food Chem 2008; 56(22): 6046 - 53.
3. Bull R. Carcinogenic effects of acryl amide in Sencar and A/J mic, Cancer Res 1984; 44(37): 107-11.
4. Johnson K. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. Toxicol Appl Pharmacol 1986; 85(3): 154 - 68.
5. Brathen E. Effect of temperature and tim on the formation of acryl amide in starch- based and cereal systems, flat breads and bread. Food Chem 2005; 92(65): 693-700.
6. Schieberle P, Köhler P, Granvog M. New aspects on formation and analysis of acryl amide. Adv Exp Med Biol. 2005;561:205-22
7. Lindsay RC, Jang S. Model systems for evaluating factors affecting acryl amide formation in deep fried foods. Adv Exp Med Biol. 2005;561:329-41.
8 . Friedman M. A lifetime oncogeicity study in rats with acryl amide. Toxicol Sci 1995; 27(31): 95-105.
9. Tareke E. Acryl amide: a cooking carcinogen chemistry. Res Toxicology 2000; 13(13):517-22.
10 . Paulsson B. Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acryl amide or N-methyl acryl amide treatment. Mutation Res 2002; 516(20):101-11.
11. Mucci LA, Dickman PW, Steineck G, Adami HO, Augustsson K. Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. Br J Cancer 2003; 88(1): 84 - 9.
12. Mucci L. Aacryl amide intake and breast cancer risk in Swedish women. JAMA 2005; 293(11): 1326 -7.
13. Mucci LA, Adami HO. The role of epidemiology in understanding the relationship between dietary acryl amide and cancer risk in humans. Adv Exp Med Biol. 2005;561:39-47.
14. Swenson K. Dietary intake of acryl amide in Sweden food. Chem Toxicol 2003; 41(11): 1581-86.
15. Braum M. Acryl amide and glycidamide: approach towards risk assessment based on biomarker guided dosimetry of genotoxi/mutagenic effects in human blood. Chemistry and safety of Acryl amide in F00d 2005; pp: 77- 88.
16. Klaunig JE, Kamendulis LM. Mechanisms of acryl amide iduced rodent carcinogenesis. Adv Exp Med Biol. 2005;561:49-62.
17. FAO/WHO. Consultation on health implication of acryl amide in food، report of a a joint FAO/WHO. Consultation, Geneva, Switzerland, Available: http://www. Who. Int/foodsafety/ publications/ chemistry/ en 2005; Pdf: 25 - 27.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12 ]

18. FAO/WHO. Expert committee on f00d additives, summary and conclusions of sixty-forth meeting JECFA 2005; pp: 1- 47.

19. Fennell TR, Friedman MA. Comparison of acryl amide metabolism in humans and rodents. Adv Exp Med Biol. 2005;561:109-16.

20. Claudio P. Dietary acryl amide and human cancer attilio Giacosa5 and Carlo La Vecchial. Int J Cancer 2006; 118(6):467- 71.

21. Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer. Am J Clin Nutr 2008; 87(5): 1428-38.

22. Lingnert H. Acryl amide in food: Mechanisms of formation and in uencing factors during heating of food. Scandinavian Journal of Nutrition 2002; 46(4): 159 - 72.

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

24. 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 Int 2009; 42(9): 1295 - 302.

25. Stadler RH, Blank I, Varga N. Acryl amide from Maillard reaction products. Nature 2002; 419(6906): 449 - 50.

26. Claus A. Acryl amide in cereal products: a review. J Cer sci 2008; 47(2):118 - 33.

27. Claus A. Impact of formulation and technological factors on the acryl amide content of wheat bread and bread rolls. J Cer sci 2008; 47(3): 546 - 54.

28. Claus A. Influence of agronomic factors and extraction rate on the acryl amide contents in veast-leavened breads. J Food Chem 2006; 54(23): 9876 - 86.

29. Springer M, Fischer T. Lehrack A, & Freund W. Development of acryl amide in baked products. Getride Mehl und Brot 2003; 57(5): 274 - 8.

30. Vahedi H, Azizi MH, Kobarfard F, Barzegar M, Hamidi Z. The effect of flour extraction rate، and amount asparaginase enzyme on reduction free asparagine (basic precursors carcinogen matrial acryl amide formation) in bread dough. Journal of Ofogh - E- Danesh 2012; 18(2): (in press).

31. Wang A, Lee S, & Shuang M. . Journal of Micro Chemical 2008 89; (42): 90 - 97.

32. American Association of Cereal Chemists. AACC Methods 80- 40.01: Determination of simple sugars in cereal products - HPLC method. 10th ed. vol. 1, p. 1-3.; 2000.

33. Faridi HA, Finney P. Technical and nutritional aspects of Iranian breads. Bakers Digest 1980; 54(5): 18- 22.

34. Monica A, Barbara Q, Jesus F. Modeling the effect asparaginase in reducing acryl amide formation in biscuits. Food Chem 2011; 126(2): 435 - 40.

35. Petersson E. Rosen J. Critical factors and pitfalls affecting the extraction of acryl amide from foods: An optimization study. Analytica Chimical Acta 2006; 557(1-2): 287 - 95.

36 . Nielsen N. A liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acryl amide and the precursors, asparagine and reduction sugars in bread. Analytica Chimica Acta 2006; 557(27): 211- 220.

37. Rosén J, Nyman A, Hellenäs KE.. Retention studies of acryl amide for the design of a robust liquid chromatography - tandem mass spectrometry method of food analysis. J Chromatogr A. 2007; 1172(15): 19 - 24.

38. Yaylayan VA, Wnorowski A, Perez Locas C. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. J Agric Food Chem 2003; 51(7): 1753 - 1757.

39. Hansen H. Grain characteristics chemical composition, and functional of rye (Scale cereal L.) as influenced by genotype and harvest year. J Agric Food Chem 2004; 52(8): 2282 - 91.

40. Hanne V. Evaluating the potential acryl amide mitigation in a range of food products using an asparaginase from aspergillus oryzae. J Agric Food Chem 2009; 57(10): 4168 - 76.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12 ]

# The effect of flour extration rate, amount of asparaginase enzyme, and baking temperature and time on acrylamide formation in Sangak bread

*Vahedi H[1], Azizi MH*[2], Kobarfard F[3], Barzegar M[4], Hamidi Esfahani Z[4]*

*1- Ph.D Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.*

*2- *Corresponding author: Associate Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: azizit_M@modares.ac.ir*

*3- Associate Prof, Dept. of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences,Tehran، Iran.*

*4- Associate Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.*

**Received 29 Nov, 2011** **Accepted 26 Feb, 2012**

**Background and Objective:** Acrylamide is a carcinogen element which is formed at temperatures higher than 120°C in the foods rich in carbohydrates, such as Sangak bread.

**Materials and Methods:** At first, a series of confirmed mechanisms effective on the formation of acrylamide was determined: Free asparagine, glucose, fructose, maltose, and sucrose sugars in two kinds of dough made from two kinds of flour with the extraction rate of %82 and %93. Then, the effect of flour extration rate, enzyme asparaginase, temperature and time needed for baking, and interactions of effectual factors was studied on the formation of acrylamide in Sangak bread. The amount of acrylamide was determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The data analysis was performed using $Spss_{16}$, $Minitab_{15}$, and Factorial test.

**Results:** A significant differenc was seen between average sugars other than sucrose in the two kinds of flour. Also, average acrylamid formed by principal factors affecting (flour extration rate, asparaginase enzyme, baking time and temperature) and reciprocal impact of the 2, 3, 4 factors showed a significant difference ($p< 0/001$). The maximum of acrylamide formation from 72 treatments caused by the reciprocal impacts of the four factors was seen at the temperature of 352$^{o}$C, baking time of 10 minutes, and flour with 93% extraction rate (without enzyme) of 60/30 ( mg/kg) and the minimum of acrylamide formation was observed at the temperature of 241$^{o}$C, baking time of 5 minutes and the flour with 82% extraction rate (with enzyme) of 13/07 mg/kg Sangak bread.

**Conclusion:** The decrease of free asparagine by asparaginase enzyme indicated that glucose and fructose were the major sources of acrylamide formation in Sangak bread. The rate of acrylamide formation increased with the increase in flour extraction rate. This rate has direct relationship with baking time and temperature. Acrylamide formation can be minimized in the presence of asparaginase enzyme. Training the bakers not to toast the bread will result in the production of healthy Sangak bread

**Keywords:** Free asparagine, Acrylamide, Enzyme asparaginase, Sangak bread, LC/MS/MS

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12 ]