# تأثير استخدام انزيم L-Asparaginase في خفض نسبة الاكريلامايد في البسكويت

حميد عبود جبر أنفال خالد فيصل مكارم علي موسى

استاذ مساعد مدرس مساعد استاذ مساعد

dr_hameedm59@yahoo.com Makaremali37@yahoo.com

قسم علوم الاغذية–كلية الزراعة– جامعة بغداد

المستخلص هدفت هذه الدراسة الى معرفة كفاءة انزيم الاسبارجينيز المنتج من عزلة محلية من بكتريا *Erwinia* spp. والمنقى جزئيا في خفض نسبة الاكريلامايد المتكونة في البسكويت . حضراربع انواع من البسكويت من طحين الحنطة هي($T_4$,$T_3$,$T_2$,$T_1$) وكانت المعاملة T1 هي معاملة السيطرة. استخدم تقنية كروموتوكرافي السائل العالي الاداء ( HPLC ) High performance liquid chromatography لتقدير نسبة الاكريلامايد في البسكويت، كما تم دراسة تاثيرأضافة الانزيم على بعض الصفات الكيميائية والريولوجيه للطحين مثل سلوكية العجينة والامتصاص المائي والنسبة المئوية لكلوتين الطحين ونشاط انزيمات الاميليز كما تم تقييم البسكويت المنتج حسيا، أوضحت النتائج ان اضافة الانزيم بفعالية نوعية 20.5 وحدة / ملغم وبنسبة 1 % من وزن الطحين ادى الى خفض نسبة تكون الاكريلامايد الى 89 % مقارنة بأنموذج السيطرة الخالي من الانزيم. وكان لاضافة الحامض الاميني الاسبارجين بنسبة 0.1 % من وزن الطحين الى الخلطة مع جود الانزيم تاثيرا سلبيا على كفاءة انزيم الاسبارجينيز في خفض نسبة الاكريلامايد في المنتوج، إذ بلغت نسبة الانخفاض57.7 %، في حين ارتفعت نسبة الاكريلامايد في المنتوج الى 233 % عنداضافة الاسبارجين الى الخلطة بغياب انزيم الاسبارجينيز. أن أضافة الانزيم الى الطحين لم تؤثرعلى النسبة المئوية للكلوتين بل ادت الى زيادة قيمة استقرارية العجينة، كما ادت ايضا الى ارتفاع في نشاط انزيمات الاميليز ، تبين من خلال التقييم الحسي ان اضافة الانزيم لم تؤثر على نوعية المنتوج اوعلى صفاته الحسية.

الكلمات المفتاحية: طحين الحنطة، الاسبارجين، تفاعل ميلارد.

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.



# EFFECT OF USING L-ASPARAGINASE IN REDUCING ACRYLAMIDE PERCENTAGE IN BISICUT

H. A. Jebur A. K. Fasil M. A. Mousa

Assist. Prof. Assist. Lecturer Assist. Prof.

dr_hameedm59@yahoo.com Makaremali37@yahoo.com

Dept. of food Sciences - Coll. of Agri. -Univ. of Baghdad

**ABSTRACT**

**This study was aimed to know the efficiency of partially purified L- asparaginase produced from local isolate from *Erwinia* spp. to reduce the percentage of acrylamide formed in Biscuit. Four types of biscuit from wheat flour were prepared (T1, T2, T3, T4),and T1 as control. High performance liquid chromatography technique was used to estimate acrylamide ratio in biscuit , Effect of enzyme addition on flour chemical and rheological properties was studied, also dough behavior ,gluten percentage, water absorption and amylase enzyme activity was estimated. The results revealed that the addition of experimental asparaginase ( specific activity 20.5 unite $mg^{-1}$ ) with 1% of flour weight lead to reduce in acrylamide formation in Biscuit to 89 % compared to control sample ( in absence of enzyme ) . Moreover, the addition of Asparagine to flour at 0.1 % of its weight, where L- asparaginase was available caused a negative effect on enzyme efficiency in reducing the acrylamide in biscuit. So the level of acrylamide was reduced to 57.7 %. In the other hand , the percentage of acryl amide in biscuit was increased to 233 % when the asparagine was added to mixture in absence of L-asparaginase .Addition of the enzyme to flour have no effect on the percentage value of gluten but improved the stability of dough .The enzyme addition also led to increase amylases activities. Addition of experimental enzyme had no effect on quality and sensory evaluation of biscuit.**

**Key words: Wheat flour, Asparagine, Maillard reaction Research is part of MSc. Thesis of second auther.**

**المقدمـــــة**

يُعد الاكريلامايد مركباً ذا خطورة تراكمية فهو يتشكل في الاغذية المقلية أو المخبوزة الغنية بالمواد الكربوهيداتية والحاوية على نسبة من البروتين نتيجة لتعرضها للمعاملات الحرارية الجافة الشديدة (6 و29). وقد أولت الجهات والمنظمات الدولية ذات الصلة بصحة الانسان اهمية كبيرة لمادة الاكريلامايد لذا فقد اجريت دراسات السمية لهذا المركب وعلى وفق نتائجها صنفتة الوكالة الدولية لبحوث السرطان International Agency for Research on Cancer (IARC) في عام 1994 على انه مركب ذو قدرة كبيرة على احداث السرطان عند الانسان، كما اثبتت البحوث تاثيراته السمية على اعصاب الانسان وقدرتة المحتمله على احداث السرطان (16). وقد وضعت منظمة الغذاء والصحة الدولية عام 1996 حداً اعلى لتركيزه في مياه الشرب عند 0.5 مايكروغرام/لتر$^{-1}$ (25)، في حين قام الاتحاد الاوربي Europe Union في عام 2002 بخفض هذا الحد الى 0.1 مايكروغرام/لتر . كان لاكتشاف الاكريلامايد في الاغذية النشوية التي تتعرض لدرجات حرارة مرتفعة من قبل ادارة الغذاء السويدية وجامعة ستوكهولم (2002) Swedish national Food Administration بمثابة صدمة كبيرة لكثير من الباحثين، بعدها تكثفت البحوث للوقوف على مستويات الاكريلامايد في الانواع المختلفة من الاغذية وآليات تشكله وإيجاد الحلول المناسبة لخفض مستوياته. إن ميكانيكية تكون الاكريلامايد في الاغذية النشوية starchy food اثناء المعاملات الحرارية العالية تعتمد على تفاعل الحامض الاميني الاسبارجين مع السكريات المختزلة ولاسيما الكلوكلوز إذ تتميز تلك الاغذية بكونها غنية بهما، وتدعى مثل هذه التفاعلات بتفاعلات ميلارد Maillard reaction ( 27 و29). ومن الوسائل المستخدمة في خفض نسبة الاكريلامايد في الاغذية النشوية هو اضافة انزيم الاسبارجينيز L- Asparaginase قبل المعاملات الحرارية، فهو يقوم بتحويل الحامض الاميني الاسبارجين الى الحامض الاميني الاسبارتيك والامونيا ومن ثم فهو يؤدي الى خفض اومنع تكون الاكريلامايد في هذه الاغذية (12و23 ). يعد البسكويت احد منتوجات الخبيز المعروفة بانتشارها وذلك لتعدد انواعه واشكاله وهو يلاقي اقبالا واسعا من قبل المستهلكين ويتناول من فئات عمريه مختلفه،ان هذا المنتوج يتميز بارتفاع نسبة السكر في محتوياته اضافة الى ان الحليب يكون احد مكوناته في اغلب الاحيان ممايشجع على تفاعلات ميلارد المرغوبة في المنتوج لاعطاء اللون والنكهة له لذلك كان الهدف هو دراسة امكانية خفض نسبة الاكريلامايد في هذا المنتوج عن طريق استخدام انزيم الاسبرجينيز.

**المواد وطرائق الفحوص الكيمياوية والريولوجية**

استعمل طحين الحنطة التركي نوع بسلر المجهز من الاسواق المحلية واجريت عليه الفحوصات الاتية:

**الرطوبة:** تم تقدير الرطوبة في الطحين حسب الطريقة، 44-40.01 المذكورة في AACC (1) بتجفيف كمية موزونة من الانموذج في فرن كهربائي على درجة حرارة 130 مْ حتى ثبات الوزن، تم احتساب الفرق في الوزن قبل وبعد التجفيف ومنها تم احتساب النسبة المئوية للرطوبة.

**نسبة الكلوتين الرطب:** قدرت نسبة الكلوتين الرطب في أنموذج الطحين باستعمال الطريقة القياسية ، المذكورة في AACC (1) باستعمال جهاز Glutomtic gluten المجهز من شركة Perten.

**اختبار الفارينوكراف Farinograph:** اجري اختبار الفارينوغراف لطحين الحنطة باستعمال الطريقة القياسية (21- 54) المذكورة في AACC (1) باستخدام جهاز الفارينوغراف IDNTNO.72002 المجهز من شركة برابندر الألمانية وتمت دراسة المؤشرات الاتية من منحنى الفارينوغراف:

أ.النسبة المئوية للامتصاص المائي Water absorption percentage للطحين على مستوى رطوبة 14 %.

ب- وقت نضج العجينة (دقيقة) Dough development time.

ج – الاستقرارية (دقيقة) Dough stability.

**تقدير نشاط انزيم الفا أميليز :** قدرت فعالية أنزيم الألفا أميليز باستعمال الطريقة القياسية رقم (07-22) المذكورة في AACC (1) بواسطة استخدام جهاز رقم السقوط Falling number 1-700 المجهز من شركة Perten السويدية.

**تحضير البسكويت :** تم تحضير اقراص البسكويت على وفق الطريقة المذكورة في Anese واخرون (4)، حيث تضمنت الخلطة المكونات التالية: مارجرين 40% ، سكروز35%، ماء20%، كلوكوز 5%، ملح الطعام0.7%، مسحوق الخبيز Baking powder 0.5% من وزن الطحين. أضيف مستخلص انزيم الاسبارجينيز المنقى جزئياً ذو فعالية نوعية 20.5 وحدة / ملغم الذي تم الحصول عليه من دراسة سابقة (13) وبنسبة 1 % من وزن الطحين الى المعاملة التي تحوي الانزيم(المعاملة T4, T2)، علماً بأن المستخلص الانزيمي اضيف الى الماء أولا ثم أضيف الاخير الى العجينة لضمان توزيع الانزيم على اجزاء العجينة كلها ،حضرت المعاملات الاتية:

$T_1$ / أنموذج خالي من الانزيم و الاسبارجين (معاملة سيطرة للمعاملة $T_2$وللمعاملة $T_3$).

$T_2$ / أنموذج يحتوي على الانزيم فقط.

$T_3$ / أنموذج يحتوي على الاسبارجين (بنسبة 0.1%) فقط. معاملة سيطرة للـ $T_4$

$T_4$ / أنموذج يحتوي على الانزيم والحامض الاميني الاسبارجين. وبعد مزج الخليط ترك لمدة 30 دقيقة على حرارة 4 مْ بعدها نشرت العجينة على شكل طبقة رقيقة بسمك 0.3 cm ، ثم قطعت بقطر 7cm وتركت فترة راحة على حرارة 30 م مدة تراوحت مابين 10 – 30 دقيقة، ثم جرت عملية الشوي وبأستخدام تيار هواء ساخن في فرن بدرجة حرارة 200مْ.

**التقييم الحسي:** اجري تقييم نماذج البسكويت على وفق أستمارة التقويم الحسي من قبل مجموعة من المقيمين طبقاً للدرجات المحددة في استمارة المذكورة في AACC (1) كما في (جدول 1).وتم اجراء مقارنة متوسطات القيم بتحليلها احصائيا باستخدام التصميم العشوائي التام وتحديد قيم اقل فرق معنوي LSD على مستوى معنوية 0.05 (24 ).

**جدول1. استمارة التقويم الحسي لنموذج البسكويت**

| عناصر النوعية | النسجة | الطراوة | الوزن | الطعم | الحجم النوعي | المجموع | نسبة الانتشار |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| حدود الدرجة | 10-1 | 10-1 | 20-1 | 20-1 | 40-1 | 100 | 10-1 |
| $T_1$ | | | | | | | |
| $T_2$ | | | | | | | |

**تحديد نسبة الانتشار لاقراص البسكويت**

اتبعت الطريقة القياسية المذكورة في AACC (1) لتحديد نسبة الانتشار لاقراص البسكت، وتم استخراجها من المعادلة الاتية:

**نسبة الانتشار= معدل القطر لاقراص البسكويت / معدل السمك لاقراص البسكويت**

معدل السمك لاقراص البسكويت تحضير أنموذج البسكويت لتحليل الاكريلاميد اتبعت الطريقة التي ذكرها (Anese واخرون) لتحضير أنموذج البسكويت لتحديد محتواه من الاكريلامايد، إذ اضيف 15 مل من الماء المنزوع الايونات الى 1غم من أنموذج البسكويت المطحون والموضوع في بيكر سعة 100ml وبعد التحريك على درجة حرارة 60 مْ مدة 30 دقيقة بأستخدام مازج مغناطيسي اجريت عملية نبذ مركزي بسرعة 10000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة وبدرجة حرارة 4 مْ. سحب10مل من الرائق وتم اختزال الحجم الى 2– 1.5مل بواسطة المبخر الدوار تحت الضغط المخلخل وبدرجة حرارة 80 مْ ، تم ترشيح الناتج من خلال مرشحات غشائية Millipore Membrane filters بقطر0.45 مايكرومتر وذلك قبل حقنة في جهاز كروموتوكرافيا السائل عالي الآداء High (HPLC) performance liquid chromatography المجهز من شركة Shimatzu اليابانية وكانت ظروف الفصلة

1.نوع العمود water Spherose orb, ODS2

2–ابعاد العمود ( 250 X2mm )

3–معدل الجريان Flow rate : 0.1 ml/min

4– الطور المتحرك Mobile phase : مكون من خليط Formic . Methanol 1% $H_2O$ 98.9 %::(v/v/v) acid 0.1%.

5– درجة حرارة الفصل : 30ْ م .

6- Detector type : Uv-light.

7- Wave length: 205 nm .

**5–تحضير المحلول القياسي للـ Acrylamide**

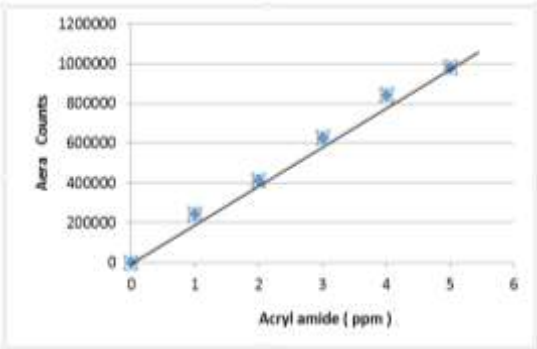
5-1 حضر محلول الاكريلاميد القياسي Stock solution بتركيز 0.05 mg/ml أو ما يعادل 50 ppm حسب ما ذكر في(22) من اذابة .0.05 gm من مادة الاكريلاميد النقي المجهز من شركة BDH الانكليزية في كمية من الماء المقطر الخالي من الايونات Deionized water وبعد المزج التام اكمل الحجم الى 1000 ml بالماء المقطر الخالي من الايونات Deionized water وحفظ المحلول بدرجة حرارة مْ.

**تحضير ال-Working solutions:** حضرت محاليل الاكريلاميد بتراكيز تراوحت من 1-5 جزء بالمليون من محلول الاكريلاميد الاساسي وحسب الجدول 2.

**جدول 2. تراكيز المحاليل القياسية لمحلول الاكريلامايد**

| المحلول الخزين بتركيز (50ppm) ml | ماء منزوع الآيونات (ml) | الحجم النهائي (ml) | التركيز النهائي لمحلول الاكريلامايد (ppm) |
|---|---|---|---|
| 0.2 | 9.8 | 10 | 1 |
| 0.4 | 9.6 | 10 | 2 |
| 0.6 | 9.4 | 10 | 3 |
| 0.8 | 9.2 | 10 | 4 |
| 1.0 | 9.0 | 10 | 5 |

تم حقن حجوم مناسبة من هذه المحاليل بجهاز HPLC وتحت الظروف المذكورة آنفاً، وقد تم احتساب وقت الاحتجاز Retention time للاكريلامايد في المحاليل القياسية ومنه تم الاستدلال على احتواء النماذج قيد الدراسة على الاكريلامايد ، كما تم عمل منحنى قياسي يربط العلاقة بين تركيز الاكريلامايد والمساحة تحت القمة للاستفادة منها في حساب تركيز الاكريلامايد في نماذج البسكويت المستخدمة في هذه الدراسة، شكل ( 1).




**شكل1: المنحنى القياسي لتراكيز الاكريلامايد (ppm) وعلاقتها بمساحة القمة وحسب نتائج التحليل بجهاز الكروموتوكرافيا عالي الاداء High (HPLC) performance liquid chromatography.**

كما تم احتساب نسبة الانخفاض في الاكريلامايد في نماذج المعاملات قيد الدراسة باتباع المعادلة التالية:

**نسبة تخفيض الاكريلامايد % = (T1)- كمية الاكريلامايد بالانموذج في الانموذج / كمية الاكريلامايد بالانموذج القياسي(T1)**

**النتائج والمناقشه**

**1- تأثير اضافة مستخلص انزيم الاسبارجنيز على الصفات الفيزيوكيمياوية والريولوجية لطحين وعجينة البسكويت.**

درس تأثير اضافة انزيم الاسبارجنيز ذو فعالية نوعية 20.5 وحدة/ملغم و بنسبة 1% من وزن الطحين على الصفات الفيزيوكيمياوية للطحين والعجينة المعدّة لصناعة البسكويت وقد اظهرت النتائج (جدول3)، ان نسبة الرطوبة في طحين معاملة السيطرة (المعاملة $T_1$)، والمعاملة التي اضيف اليها الانزيم بنسبة 1% (المعاملة $T_2$) كانت 12.7% وتعّد هذه النسب ضمن حدود نسبة الرطوبة الاعتيادية في الطحين درجة اولى والتي تتراوح نسبة الرطوبة فيه بين 10.1-16.5% (28). ويذكر ان المحتوى الرطوبي للطحين لايؤدي دوراً مهماً في تحديد جودته الا انه يعد عاملاً مهماً في قابلية حفظه في اثناء عملية الخزن، إذ كلما ارتفع المحتوى الرطوبي كلما قلت مدة خزنه.

**جدول3.الفحوصات الفيزوكيمياوية والريولوجية للطحين والعجينة**

| الفحص | $T_1$ معاملة السيطرة | $T_2$ الحاوي على الانزيم 1% |
|---|---|---|
| رطوبة % | 12.7 | 12.7 |
| كلوتين % | 27 | 27 |
| رقم السقوط (ثا) | 389 | 326 |
| معايير اختبار الفارينوكراف | | |
| الامتصاص المائي % | 57.7 | 57.5 |
| وقت النضج (دقيقة) | 2.2 | 2 |
| الاستقرارية (دقيقة) | 3.4 | 5 |

كما اظهرت النتائج ان نسبة الكلوتين في الطحين كانت % 27 في كلا المعاملتين $T_1$ و$T_2$ اي انها لم تتأثر باضافة المستخلص الانزيمي وتعدّ هذه النسبة مقاربة لما ذكره موسى

واخرون (20) الذي اشار الى ان نسبة الكلوتين في طحين الحنطة تعدّ من المؤشرات المهمة في تحديد الخواص الريولوجية للعجينة، وأن نوعية الكلوتين تعد الحد الفاصل في تحديد الجودة للطحين. كما بلغ رقم السقوط في معاملة السيطرة $T_1$ الى 389 ثانية وانخفض في المعاملة $T_2$ الى 326 ثانية مما يشير الى ان اضافة المستخلص الانزيمي أدت الى ارتفاع نشاط انزيمات الالفا اميليزوقد يعود السبب الى كون المسخلص الانزيمي منقى جزئياً وعليه قد يكون محتوياً على نسبة من انزيمات الالفا اميليز التي تساعد في خفض رقم السقوط، ويذكر ان الحدود المثالية لرقم السقوط في طحين الحنطة المعَد لصناعة الخبز يتراوح بين300– 200 ثانية(8) كما اشارت نتائج الفارينوكراف لطحين الحنطة المعد لصناعة الخبز الحاوي على الانزيم بنسبة 1% الى أنه لم يحصل تغيير في قيم الامتصاص المائي إذ بلغت % 57.5 و 57.7% لكل من المعاملة $T_1$ (معاملة السيطرة) و$T_2$ (المعاملة الحاوية على الانزيم 1%) جدول3. كما ان وقت النضج للعجينة بلغ 2.2 دقيقة في معاملة السيطرة $T_1$ وهي مقاربة للحدود التي ذكرها Zain alabaden (28) والتي كانت تتراوح بين 2–4 دقيقة لطحين الحنطة درجة اولى. وحصل انخفاض طفيف في قيمة وقت النضج في المعاملة الحاوية على الانزيم 1% اذ بلغت 2.0 دقيقة. ان وقت النضج له علاقة بمحتوى الطحين من الكلايدين والكلوتينين وهو يشير الى قوة الطحين وقابلية الشبكة الكلوتينية على تحمل عملية العجن (5). أما وقت الاستقرارية لمعاملة السيطرة $T_1$ فقد كان 3.4 دقيقة وان اضافة المستخلص الانزيمي ادت الى ارتفاع وقت الاستقرارية للعجينة الى 5 دقيقة. وتعد قيم الاستقرارية العالية مؤشراً للطحين القوي اذ تبلغ قيم الاستقرارية للطحين الملائم لتصنيع الخبز بين5–11 دقيقة (28) وان اضافة المستخلص الانزيمي بنسبة 1% ادت الى تغيير في بعض معايير الجودة للطحين مثل زيادة في استقرارية العجينة وتحسين في نشاط انزيمات الاميليز، وهذا يؤيد ماذكره Claus واخرون (10) ان وجود بعض المستخلصات الانزيمية وخاصة الاميليزوا لاميلوكلوسايديز Amyloglucosidase وبدرجة اقل البروتيز (Proteases) في خلطة المخبوزات تؤدي الى تحسن صفات المخبوزات دون ان تؤثر على مستويات الاكريلامايد في تلك المنتجات على الرغم من زيادة نسبة السكريات المختزلة نتيجة لوجود هذه الانزيمات.

**التقييم الحسي للبسكويت ونسبة الانتشار:** أظهرت النتائج ان نسبة الانتشار في المعاملة التي أضيف فيها الانزيم بنسبة 1% ($T_2$) زادت بنسبة طفيفة اذ بلغت 7 مقارنة بمعاملة السيطرة $T_1$ التي كانت فيها نسبة الانتشار6.8 (الجدول4).

**جدول 4. التقييم الحسي للبسكويت ونسبة الانتشار**

| عناصر النوعية | النسجة | الطراوة | اللون | الطعم | الحجم النوعي | المجموع | نسبة الانتشار |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| حدود الدرجة | 10-1 | 10-1 | 20-1 | 20-1 | 40-1 | 100 | 10-1 |
| $T_1$ | 6 | 7 | 17 | 16 | 34 | 80 a | 6.8 a |
| $T_2$ | 7 | 8 | 18 | 16 | 35 | 84 a | 7.0 a |

كما تشير نتائج التقييم الحسي لمنتوج البسكويت (الجدول 4) ايضا الى ان مجموع عناصر النوعية بلغت 80 و 84 % لكل من المعاملة $T_1$ , $T_2$ على التوالي، كما اشارت نتائج التحليل الاحصائي بانه لاتوجد فروقات معنوية بين عناصر النوعية في المنتج بوجود او بغياب الانزيم اي في المعاملة $T_2$ مقارنة بمعاملة السيطرة $T_1$ على التوالي ايضا، وتتفق هذه النتائج مع ما وجده Anese واخرون (4) الذي اشار الى ان استعمال انزيم الاسبارجنيز في خلطة البسكويت وبنسب مختلفة (250، 500،750،1000) وحدة/كغم الطحين لم تؤثر على قابلية البسكويت للتكسروتحسن من صفاته الحسية مثل اللون والطعم على الرغم أن تأثيره على نسبة الانتشار كان غير معنويا. كما يؤيد ذلك ماذكره kumar واخرون (17) الذي اشار الى ان اضافة انزيم الاسبارجينيز بتركيز5–300 وحدة/كغم طحين لم تؤثر على الصفات الريولوجية للعجينة كما انها لم تؤثر على الصفات الفيزياوية والحسية للخبز الناتج. ومن جهة اخرى فقد اشارت النتائج التي حصل عليها kukurova واخرون (16) انه لاتوجد فروقات معنوية بين المعاملات التي اضيف اليها انزيم

الاسبارجينيز بتركيز100–500 وحدة/كغم من وزن الطحين والمعاملات التي لم يضف اليها الانزيم من حيث الصفات الحسية مثل ظهور اسمرار اللون browning أو تكون المركبات التي تدلل على حدوث تفاعلات ميلارد مثل مركب Hydroxy methyl furfural

**تأثير اضافة انزيم L- Asparaginse على نسبة الاكريلامايد المتكونة في البسكويت 5–1 تأثير اضافة الانزيم L- Apsaraginase**

اظهرت نتائج HPLC أن اضافة انزيم L-Apsaraginase وبتركيز 1% أدت الى خفض نسبة الاكريلامايد بنسبة 89% المعاملة ( $T_2$ مقارنة بالأنموذج القياسي للبسكويت والمحضر بنفس الظروف السابقة المعاملة($T_1$) إذ كانت كمية الاكريلامايد المتكونة في المعاملة $T_2$ هي 0.1 ppm في حين كانت كمية الاكريلامايد في المعاملة القياسية ($T_1$)هي 0.91 ppm (جدول 5)، مما يشير الى ان اضافة الانزيم أدت الى تحطيم الحامض الاميني الاسبارجين الموجود اصلاً في عجينة البسكويت خلال فترة اعداد العجينة وبالتالي فقد ساهم الانزيم في تقليل فرصة تكون الاكريلامايد.

**جدول5 . تأثير اضافة الاسبارجنيز في مستوى الاكريلامايد**

| المعاملات | كمية الاكريلامايدppm | سبةالانخفاض او الزيادة في الاكريلامايد نسبة لمعاملة السيطرة % |
|---|---|---|
| T1 | 0.91 | ــــ |
| T2 | 0.10 | 89 |
| T3 | 3.031 | 233 |
| T4 | 0.385 | 57.7 |

وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره Mario واخرون (19) الذي اشار الى ان اضافة انزيم الاسبارجينيزالى المعجنات المخبوزة ادى الى تخفيض في نسبة الاكريلامايد المتكونة الى 90%. وجد Kukurova واخرون (16) أن اضافة انزيم الاسبارجينيزبمعدل (100 – 500 وحدة /كغم طحين) الى خلطة العجينة ادت الى تحويل 96–97% من الاسبارجين الى حامض الاسبارتيك الامر الذي ادى الى خفض نسبة تكون الاكريلامايد بنسبة 90 %، في حين وجد Ciesarova واخرون (9) أن أضافة أنزيم الاسبارجينيز بتركيز1 وحدة / غم على درجة 37م مدة 30 دقيقة ادت الى خفض نسبة الاكريلامايد في لبطاطا الى 97% بعد تعريضها الى حرارة 180مْ مدة 20 دقيقة. حصل Franco واخرون (14) على نتيجة مقاربة عند اضافة انزيم الاسبارجينيز الى البطاطا المسلوقة بمقدار 1000 وحدة انزيمية/كغم على درجة 50 مْ مدة 20 دقيقة، إذ وجد أن معدل اختزال الاكريلامايد كان مساويا الى 90 %. وقد فسر ذلك بان عملية السلق اسهمت بتغيير التركيب البنائي لانسجة البطاطا مما سهل من انتشار الانزيم بشكل اوسع وادى الى زيادة فرص تحطم الاسبارجين من قبل الانزيم ومن تثبيط تكون الاكريلامايد.

**5–2 تأثير اضافة الحامض الاميني L-Asparagine**

لمعرفة دور الحامض الاميني الاسبارجين في تكون الاكريلامايد، اضيف هذا الحامض الى خلطة عجينة البسكويت بنسبة 0.1 % دون استخدام انزيم L-Asparaginase المعاملة $T_3$ وتم مقارنتها مع المعاملة القياسية الخالية من الانزيم $T_1$، اظهرت نتائج HPLC (جدول 5) ان اضافة الحامض الاميني الاسبارجيين الى عجينة البسكويت المعاملة $T_3$ ادت الى زيادة تكون الاكريلامايد بمقدار 233% مقارنة بالمعاملة القياسية $T_1$، إذ كانت كمية الاكريلامايد المتكونة في تلك المعاملات هي 3.031 ppm و 0.91 ppm على التوالي. وقد يعود سبب ارتفاع الاكريلامايد الى الارتفاع في نسبة الاسبارجين المضافة الى كمية الاسبارجين الموجودة اصلا في الطحين والتي تتراوح بين8.7–24.9ملغم/ كغم حسب ماذكره Taeymans واخرون(25)، مما يشير الى دور هذا الحامض في تشجيع تكون الاكريلامايد في ظروف المعاملات الحرارية العالية لاعداد هذا المنتوج . وهذا يؤيد ما ذكره Zyzak واخرون (29) و Amrein واخرون (3) الذي اشار الى الدور المهم الذي يؤديه الحامض الاميني الاسبارجين في تكون المركبات الوسطية لتفاعلات ميلارد والتي تساهم بالتالي في رفع نسبة الاكريلامايد في الاغذية النشوية. كما اشار Claus واخرون (11) الى أن تحرر بعض الاحماض الامينية مثل الاسبارجين في طحين الحنطة والشيلم نتيجة لازدياد فعالية الانزيمات المحللة للبروتينات وزيادة تركيزه من 13.7 الى 48.5 ملغم / 100 غم يؤدي الى زيادة تكون الاكريلامايد بنسبة 250 % في المنتوجات المخبوزة التي يستخدم فيها هذا النوع من الطحين، لذلك لاينصح باستخدام هذا النوع من الطحين في صناعة المخبوزات حتى اذا تم خلطه بانواع اخرى من الطحين. في

حين وجد Muttucumaru واخرون (21) ان نسبة الاكريلامايد تقل بمقدار 80% في الطحين المعامل حراريا اذا انخفضت كمية الاسبارجين من 92.1 ملي مول/كغم الى 4.62 ملي مول/كغم في طحين الحنطة التي اضيف اليها السماد الكبريتي. كما اكد Claus واخرون (11) لغرض تخفيض نسبة الاكريلامايد في منتجات الحبوب ينبغي استخدام طحين ذا محتوى منخفض من الاسبارجين مع مراعاة الظروف التصنيعة. تشير نتائج هذه الدراسات فضلا عن الدراسة الحالية الى الدور المهم الذي يؤديه الاسبارجين في رفع نسبة الاكريلامايد في المنتجات التي يتم اعدادها باستخدام المعاملات الحرارية العالية.

**3-5 تأثير اضافة انزيم الـ L- Asparaginase بوجود الحامض الاميني L- Asparagine**

لمعرفة كفاءة انزيم L-Asparaginase المنقى جزئيا والمنتج من عزلة محلية من بكتريا *Erwinia carotovora AH88* بوجود الحامض الاميني Asparagine فقد اضيف الانزيم والحامض الاميني Asparagine الى عجينة البسكويت $T_4$ بالنسب نفسها السابقة وتمت مقارنتها بالمعاملة القياسية $T_1$ الخالية من الانزيم والحامض. أظهرت النتائج HPLC (جدول5) بأن نسبة الاكريلامايد في المعاملة $T_4$ قد ارتفعت بمقدار 57.7% مقارنة بمعاملة السيطرة $T_1$، إذ بلغت كمية الاكريلامايد 0.385 جزء بالمليون في المعاملة $T_4$، في حين بلغت 0.91 جزء بالمليون في المعاملة $T_1$. وعند مقارنة هذه النتيجة بالنتائج السابقة فأنها تؤكد مرة اخرى دورالحامض الاميني Asparagine في رفع نسبة الاكريلامايد لدرجة انعكس ذلك سلباً على كفاءة الانزيم، حيث انخفضت كفاءة الانزيم في خفض نسبة تكون الاكريلامايد بنسبة حوالي 35 % مقارنة مع المعاملة التي استخدم فيها الانزيم عند عدم وجود الحامض الاميني الاسبارجين $T_2$. وتتفق هذه النتائج مع ماذكره Brathen واخرون (7) إذ درس تاثير اضافة عدة احماض امينية الى خلطة المعجنات على نسبة تكون الاكريلامايد فقد وجد ان أضافة الكلايسين بنسبة 1.5- 3.5% من وزن الطحين تؤدي الى خفض نسبة تكون الاكريلامايد بنسبة 80% لانه في هذه الحالة يحصل تنافس بين الكلايسين والاسبارجين للتفاعل مع السكريات المختزلة فيؤدي تفاعل الكلايسين مع تلك السكريات الى تقليل الفرصة امام الاسبارجين للتفاعل بها ومن ثم تخفيض او منع تكون الاكريلامايد. وفي دراسة اشار Levine & Smith (18) الى ان للاحماض الامينية الكبريتيدية مثل السستئين والمثيونين دورا مشابها للكلايسين في منافسة الاسبارجين في تخفيض نسبة الاكريلامايد، حيث ادت اضافة الستستين والمثيونين الى عجينة البسكويت الى خفض نسبة تكون الاكريلامايد بما يعادل 50 %. ونستنتج من هذا أن لوجود الحامض الاميني الاسبارجين دورا فعالا في تكون الاكريلامايد، كما ان لاضافة انزيم الاسبارجينيز دوراً مهماً في خفض نسبة الاكريلامايد التي تتكون في البسكويت، لذلك توصي هذه الدراسة الى تثبيت استخدام مستخلص انزيم-L asparaginase المنتج من العزلة محلية من بكتريا *Erwinia* spp. في اعداد انواع البسكويت لغرض خفض نسبة الاكريلامايد المتكونة فيه الى ادنى حد ممكن، الى جانب الطرائق الاخرى المستخدمة لنفس الغرض اعلاه والمتعلقة بالتحكم بالظروف التصنيعية لانتاج البسكويت أو الاغذية النشوية الاخرى.

**REFERENCES**

1.AACC. 2000. Approved Methods of Analysis: Methods: 44-40.01, 38-77, 54-21, 22-07. The American Association of Cereal Chemist., St. paul, Minesota, U.S.A

2.AACC .1984. Approved Method of Ana - lysis: Method: 10-31 the American Assoc - iation of Cereal Chemist. , St. paul , Minesota , U.S.A.

3.Amrein, T., B. Schoenbaechler , F. Esch - erand and R. Amadò. 2005. Acrylamide in ginger bread: critical factors for formation and possible ways for reduction. Journal of Agricultural and Food Chemistry , 52:4282-4288.

4.Anese, M., B. Quarta and J. Frias 2011 . Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. Food chemistry, 126 (2) : 435 - 440.

5.Awad, A. 2000. Study Relationship Between Physical and Chemical Properties with Quality Properties for some Iraqi Wheat varieties.MSc Thesis,Agri college, Baghdad univ pp:18-22.

6.Becalski, A- Lau, B. P. Lewis and D. Sea - man. 2003. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and mo deling. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51. pp. 802-808.

7. Brathen, E., A. Kita and S. Knutsen . 2005. Addition of glycine reduce the content of acryl amide in cereal and potato product . Journal of Agri. Food Chemistry ,53: 3259- 3264.
8.Carl, L. G. 2006. Understanding the Falling Number Wheat Quality Test . http://www.udel.edu/FREC/PUBS/ER06-02.pdf.
9. Ciesarová, Z., E. Kiss and P. Boegl, P. 2006. Impact of L-asparaginase on acrylam - idecontent content in potato products. Journal of Food Nutrition and Research , 45 (4) : 141-146.
10. Claus, A., M. Mongili, G. Weisz , A. Schieber and R. Carle. 2008. Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. Journal of Cereal Science, 47 (3): 546–554.
11. Claus, A., P. Schreiter, A. Weber, S.Graeff, W, W. Claupein, and R. Carle. 2006. Influence of agronomic factors and extraction rate on the acrylamide contents in yeast-leavened breads. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54:8968–8976.
12.El-shafei, A. M. , M.M. Hassan , M.A. Abouzeid , D.A. Mahmoud and D.H. Elgh - onemy. 2012. Purification , Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum*NRC829. British Microbiology Research Journal . 2(3):158-174.
13.Faisal, A .2014. Production of L-Aspar - aginase from Local Isolate of *Erwinia Spp.* and Studying its Effect on Acrylamide Reduction. Msc Thesis, College of Agriculture. Baghdad. Uni. Iraq.
14. Franco. P., S. Mariotti ; K. Granby and J. Risum. 2011 . Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching . Food Science and Technology, 44(6) : 1343-1554.
15.JEFCA. 2007. Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives. Compendium of Food Additive Specifications. No. 4 FAO JECFA Monographs, Joint FAO/ \WHO Expert Commmotte on Food Additives. www.fao.org/ag/jefca-additives/specs/monograph4/additive-498-m4.pdf
16. Kukurova, K ., F. Morales , A. Bednar - ikova and Z. Ciesarova. 2009. Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried dough pastry model . Molecular Nutrition & Food Research, 53(12) : 1532–1539.
17. Kumar, K. , S. S. Punia and V. Neelam. 2012 Media optimization for the production of anti-leukemic enzyme L- Asparaginase from *E. coli* K-12. Annals of Biological Research. 3 (10):4828-4837.
18.Levine, R.A. and R.E. Smith. 2005. Sources of variability of acrylamide levels in a cracker model. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 4410–4416.
19.Mario, S., K. Sandra and I. Polikarpov. 2007. Structure, substrate complexation and reaction mechanism of bacterial asparaginases. Current Chemical Biology, 1: 75-86.
20.Mousa. M., A.E.Ktheir. and T.H. Ahmad. 2010. Study the important of assessing gluten content as a guide in predicting the quality of wheat flour and their suitability for the preparation of bread .Food Industrial and Biotechnology Conference .Al Baath Univ.
21.Muttucumaru , N., N. Halford, , S. Elmore, A. Dodson, M. Parry, P. Shewry, and D. Mottram. 2006 . Formation of high levels of acrylamide during the processing of flour derived from sulfate-deprived wheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 8951–8955.
22. Paleologos, E. K. and M. G. Kontominas. 2005. Determination ofAcrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection. J. Chromatogr. A. 1077: 135–128.
23.Sevitri, N. A. and W. Azmi. 2003 .Depar - tment ofBiotechnology , Himachal Pradeh university summer.hill, Shimla 171
24. Steel,R.G. and J.M. Torri 1989. Principles and Procedures of Statistics: A biometrical approach McGraw-Hill International Book Co. U.S.A. p: 481
25.Taeymans, D., J. Wood , P. Ashby, I. Bla - nk, A. Studer , R. Stadler and D. Silvian . 2004 . A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. Critical Reviews in Food Science and Nutrition , 44: 323–347.
26.WHO/FAO.2002.FAO/WHO consultation on the health implications of acrylamide in food. Food and Agriculture Organization of

the United NationWorld Health Organization , Geneve .June 25-27.

27.Yaylayan, V.A., A. Wnorowski and C. L. Perez. 2003 .Why Asparagines needs carboh - ydrates to generate acrylamide. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 1753–1757.

28.Zain Alabaden, M.W. 1979 . Study Instill the Standard Properties for Iraqi Bread and Samoon Flour . MSc Thesis. Agriculture College .Baghdad. Univ.

29.Zyzak, D., R.Sanders , M. Stojanovic , G. Rizzi, and M. Villagran. 2003. Acrylamide formation mechanism in heated foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 4782-478.