

Enzymes as Potential Source for Clean Label Bakery Product: Part 2, Mechanism, Application, and Optimization Combination Enzymes

Evita Riviani Achmadi^{1*}

¹Alumni Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281

* email korespondensi : evita.achmadi@gmail.com

ABSTRACT

Background: *Food enzyme is important ingredient for bakery industry to improve production process, functional properties and characteristic bakery product. Food enzyme can be applied as single or combination enzyme based on purpose which is need on processing. Based on several literatures, application combination enzymes more effective than single enzyme, due to synergism effect between enzyme which combine. Combination enzymes can be mixed from same or different class of enzyme, it is depended on selected specification and characteristic enzyme. Application of combination enzymes commonly act as processing aid which added in flour while mixing process. Therefore, it is important to understand work mechanism of combination enzyme in processing stage especially mixing, fermentation and baking. Synergism in combination enzyme can be enhance using optimization method to improve quality of processing and bakery product. Response Surface Methode (RSM) with Central Composite Design (CCD) as a design experiment is the most effective and efficient method which commonly applied for modelling and optimization in food processing. This method helps to make informed decision on a process with the objective of improving efficiency and minimizing cost while maintaining quality.*

Scope and approach: *This review explain about the role combination enzyme application in bakery product which discuss under four main headings include (i) Application of combination enzymes in bakery product (ii) Mechanism combination enzymes to enhance bakery product quality include processing (mixing, fermentation and baking) and sensory properties (texture, taste, colour and appearance) (iii) Optimization of combination enzyme in bakery product using Respond Surface Method (RSM) (iv) Regulation food enzyme usage in United State, European Union and Indonesia. Evaluation mechanism, application and optimization of combination enzymes can be used as a base for sustainable development bakery product which is safe for consume and accordance to food regulation. The differences regulation between country can be considerate when supply and distribution chain of industrial and retail food companies stretch around the globe.*

Key findings and conclusion: *The combination of enzymes provides a synergistic effect depending on the type and mechanism enzymes which is affected each other. Type and mechanism enzymes can be affected with process parameter and ingredient which is a part of food matrix while processing runs. Therefore, the suitability between process parameters, ingredient, specifications and characteristics enzyme are needed to gives significant results for optimization of enzyme combinations in bakery production. Understanding the role of enzymes as a part of food system is important as a basic knowledge in selection of enzymes to be combined. This helps researchers and developers to optimize the combination of enzymes by taking into account conditions of the process stages in bakery production. RSM with CCD as design experiments is the most efficient method because its only requires a small amount runs. CCD uses the build-up principle to build a quadratic model using the information gathered from the 2ⁿ factorial design. If the linear model of the 2ⁿ factorial is not significant, it is possible to design another trial based on the CCD principle to improve the model. Model improvement using build-up principle is suitable with the food industry*

needed, which requires fast, precise and accurate validation and verification in making decisions in terms of product development and production process.

Keyword : *combination enzymes, RSM (Response Surface Method), CCD (Central Composite Design), regulation, mechanism, application*

1. PENDAHULUAN

Perkembangan teknologi proses dan aplikasi enzim pangan memberikan efek yang signifikan bagi industri pangan maupun konsumen. Enzim pangan merupakan ingredien yang sangat penting di industri bakeri untuk meningkatkan proses produksi, sifat fungsional dan karakteristik produk bakeri. Penggunaan enzim pada produk bakeri dapat berupa *single* atau kombinasi enzim. Hal ini didasarkan pada tujuan akhir yang ingin dicapai pada produk bakeri disesuaikan dengan jenis, mekanisme kerja dan sifat enzim terhadap ingredien dan komponen lain pada sistem pangan. Kombinasi enzim dapat berpengaruh positif terhadap reologi adonan, proses pengolahan dan karakteristik produk bakeri dengan memanfaatkan sinergisme enzim pada matriks pangan selama tahapan produksi. Enzim sebagai *processing aid* pada umumnya ditambahkan pada tepung selama proses *mixing* pada pengolahan produk bakeri. Penambahan enzim dengan cara ini perlu memperhatikan interaksi enzim dengan enzim lain, interaksi enzim dengan ingredien lain, kondisi proses dan faktor – faktor yang berpengaruh terhadap kerja enzim. Interaksi tersebut dapat berpengaruh secara antagonis maupun sinergis dalam peningkatan kualitas produk bakeri.

Sinergisme dapat diartikan sebagai penggunaan kombinasi bahan-bahan tertentu yang dapat menghasilkan aksi dan pengaruh yang dapat melebihi jumlah pengaruh dari masing-masing komponen. Fenomena ini merupakan hal yang khas pada enzim sebagai keberlanjutan aspek pada penggunaan dan pengendalian pengaruh enzimatik. Identifikasi, deteksi dan pembentukan sejumlah sinergisme katalisis yang spesifik oleh enzim dapat dilakukan berdasarkan analisis statistik eksperimental yang kompleks (Miguel et al, 2013). Penggunaan campuran enzim umum digunakan pada industri dan tersedia secara komersial. Enzim dapat bekerja secara individual atau memiliki pengaruh sinergis. Trend pengembangan enzim dapat dilakukan dengan memilih dan mengontrol campuran enzim yang dapat bekerja secara sinergis dan memberikan pengaruh yang lebih baik dibandingkan dengan *single* enzim pada komponen tepung yang berbeda (Dicagno et al, 2003). Pemahaman keseluruhan proses pengolahan bakeri dapat dijadikan pertimbangan dalam hal pemilihan kombinasi enzim yang akan digunakan. Pemahaman yang baik menghasilkan konsep karakteristik produk yang optimal pada setiap tahapan proses sehingga dapat diaplikasikan design optimasi kombinasi enzim secara bertahap. Optimasi kinerja enzim diutamakan pada tahapan pembentukan adonan, fermentasi dan *baking*.

Kinerja enzim dapat dioptimalkan sampai pada tingkat molekular sehingga menghasilkan efektifitas dan efisiensi pada setiap tahapan proses. Desain dan optimasi eksperimental terintegrasi yang diikuti dengan analisis kimia, eksperimen reologi, dan *baking trial* diperlukan untuk memberikan solusi terhadap masalah yang lebih rumit (Almeida dan Chang, 2012). Hal tersebut berkaitan dengan evaluasi penggunaan kombinasi enzim pada produk bakeri yang dapat dilakukan dengan pendekatan sebagai berikut: i) aplikasi kombinasi enzim pada produk bakeri ii) mekanisme kombinasi enzim dalam meningkatkan kualitas produk bakeri meliputi proses pengolahan (*mixing* adonan, fermentasi, *baking*) dan sifat sensoris (tekstur, rasa, warna dan appearance) iii) optimasi kombinasi enzim pada produk bakeri iv) regulasi penggunaan enzim pangan US, EU dan Indonesia. Pendekatan yang komprehensif dalam hal aplikasi dan regulasi meningkatkan kesadaran peneliti dan formulator dalam pemilihan enzim pangan. Hal tersebut berkaitan dengan rantai pasok dan distribusi produk pangan yang meluas ke berbagai negara dengan regulasi yang berbeda, sehingga perlu jaminan keamanan produk pada semua kategori pangan.

2. APLIKASI KOMBINASI ENZIM PADA PRODUK BAKERY

Mekanisme kerja kombinasi enzim dipengaruhi oleh peran masing – masing enzim yang dikombinasikan. Pemahaman peran enzim diperlukan untuk melakukan evaluasi tahap awal pengaruh sinergisme enzim yang diintegrasikan dalam produk bakeri. Peran enzim pada sistem pangan dapat dilihat pada Tabel 1, pengaruh dan mekanisme kerja kombinasi enzim pada produk bakeri dapat dilihat pada Tabel 2 dan sinergisme kombinasi enzim dalam meningkatkan parameter kualitas produk bakeri dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 1. Peran Enzim Pada Sistem Pangan

Enzim	Substrat pangan	Peran Dalam Reaksi
α -Amylases (EC 3.2.1.1) or α -(1,4)- glucanhydrolases	Amilosa dan amilopektin	Hidrolisis ikatan $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-glycosidic [endo], membebaskan α -dextrins
β -Amylases (EC 3.2.1.2)	Amilosa dan amilopektin	Hidrolisis ikatan $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-glycosidic [exo], membebaskan β -dextrins and β -maltose
Maltogenic α -amylase (EC 3.2.1.133)	Amilosa dan amilopektin	$\alpha(1\rightarrow4)$ -D-glycosidic, membebaskan maltose
Cellulase (EC 3.2.1.4)	Selulosa dan β -glucan	Hidrolisis ikatan $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glycosidic [endo]
Endo β (1,4)-D-xylanase (EC 3.2.1.8) or endoxylanase	Arabinoxylan	Hidrolisis ikatan $\beta(1\rightarrow4)$ -D-xylosidic
Proteases (EC 3.4.)	Protein gluten Gliadin dan glutenin	Hidrolisis ikatan peptida
Transglutaminases Protein-glutamine γ -glutamyl-transferase (EC 2.3.2.13)	Protein Gluten	Reaksi transfer acyl antara γ -carboxyamide dan amines utama
Lipase (EC 3.1.1.3)	Triacylglycerols	Hirolisis ikatan ester, membebaskan asam lemak bebas
Glicose oxidase (EC 1.1.3.4) β -D-glucose:oxygen 1-oxidoreductase	β -D-glucose	Oksidasi β -D-glucose menjadi asam gluconic
Lipoxygenase (EC 1.13.11.12) linoleate:oxygen 13-oxidoreductase	Polyunsaturated fatty acids	Oksidasi asam lemak
Laccase (EC 1.10.3.2)	Feruloyl esters of arabinoxylans;	Oksidasi grup fenol

Sumber : Miguel et al, 2013

Tabel 2. Pengaruh dan Mekanisme Kerja Enzim Pada Produk Bakery

Kombinasi Enzim	Mekanisme	Pengaruh	Produk	Referensi
Phytase, amilase, galaktosidase, asparaginase	Phytase memecah asam fitat dan meningkatkan aktivitas amilase dan asparaginase. Aktivitas asparaginase menurunkan kandungan asparagin bebas. α -amilase dan α -galaktosidase memproduksi glukosa dan gula reduksi lain yang mudah dikonsumsi <i>Lactobacillus</i> dan dikonversi menjadi asam laktat.	Menghasilkan roti dengan akrilamida rendah dan menurunkan pembentukan hidroksi metil furfural	Roti <i>whole wheat</i> dengan formulasi <i>sourdough</i>	Abedi et al, 2022
Xylanase (X), amilase (A), glucose oxidase (GO), lipase (L)	(A+GO), meningkatkan produksi gas dengan meningkatkan level gula yang dapat difermentasi. (GO+X), GO menurunkan kapasitas penyerapan air adonan dengan gelas <i>arabinoxylan</i> larut air. X berperan dalam pembentukan fragmen <i>small arabinoxylan</i> . (X+A), X melarutkan <i>arabinoxylan</i> dari polisakarida bukan pati. A memproduksi gula yang dapat difermentasi dan meningkatkan	Struktur adonan kuat, meningkatkan volume, menurunkan densitas, remah halus, mengurangi cita rasa pahit, adonan lebih kering dan kokoh. Volume spesifik tinggi, menurunkan kekerasan remah, nilai tinggi pada sensoris: kelembutan remah, elastisitas, kemanisan dan keseluruhan penerimaan. Meningkatkan volume spesifik, meningkatkan resiliensi adonan dan ekstensibilitas yang disebabkan penurunan viskositas, menurunkan kekerasan remah dengan struktur yang baik.	<i>Straight and sourdough</i> roti dari tepung Teff	Alaunyte et al, 2012

	produksi CO ₂ oleh <i>yeast</i> . (L+A), sifat <i>thermostable</i> yang lebih baik pada pembentukan kompleks amilose-lipid.	Meningkatkan volume roti, berpengaruh lebih baik pada <i>straightdough</i> dengan penambahan fat.		
Glukolipase, hemiselulosa, hexose oxidase	Glukolipase bekerja pada <i>tensoactive insitu</i> lipid menjadi lebih polar sehingga polaritas dan aktivitas lipid pada permukaan meningkat. Hemiselulosa menyebabkan <i>intercrossing</i> fragmen <i>arabinoxylan</i> yang meningkatkan kapasitas penyerapan air <i>arabinoxylan</i> . Pelarutan <i>arabinoxylan</i> meningkatkan viskositas dengan pembentukan gel elastis. Hexose oxidase menghasilkan hidrogen peroksida yang mampu menginduksi jembatan disulfida antar protein sehingga menguatkan gluten. Hexose oxidase juga mempengaruhi oksidasi <i>arabinoxylan</i> melalui <i>ferulic acid</i>	Kombinasi glukolipase, hemiselulase dan hexose oksidase berpengaruh terhadap bentuk yang baik pada roti (bentuk potongan dilihat dari irisan maupun tinggi roti) Toleransi terhadap <i>proofing</i> , pengembangan yang bagus saat di oven, spesifik volume tinggi, meningkatkan stabilitas dan fleksibilitas adonan.	Roti dengan campuran tepung gandum utuh dan tepung gandum halus	Almeida dan Chang, 2012
Xylanase, α-amilase	α-amilase berperan meningkatkan gula yang dapat difermentasi sehingga dapat digunakan <i>yeast</i> untuk memproduksi	Volume dan visual struktur baik, volume lebih tinggi, mempertahankan kemampuan roti dan	Roti dari tepung gandum	Baratto et al, 2016

	CO ₂ . Xylanase melakukan redistribusi air sehingga meningkatkan volume gluten.	masa simpan lebih lama.		
Enzim yang berperan pada ikatan silang gluten. (Transglutaminase, glucose oxidase, laccase) Enzim yang berperan pada degradasi polisakarida dan gluten (α -amylase, xylanase, protease) Amilase (AMYL); Xylanase (XYL); Transglutaminase (TG); Protein (PROT); Laccase (LAC); Glucose oxidase (GO)	AMYL, XYL and PROT beraksi pada karbohidrat berpengaruh pada reologi adonan berkelanjutan pada proses <i>resting</i> . TG berperan pada ikatan silang fraksi protein yang berbeda. XYL and AMYL beraksi pada fraksi polisakarida adonan. PROT dan TG beraksi pada fraksi protein adonan, memodifikasi derajat polimerisasi protein dan interaksi pati- protein. Kombinasi PROT dan TG berpengaruh terhadap perubahan jumlah residu hidrofobik yang terekspos sehingga meningkatkan ketersediaan air pada adonan. LAC mengkatalisis gelasi oksidatif dari <i>arabinoxylans</i> feruloilasi dengan melakukan dimerisasi <i>ester ferulic</i> . LAC berperan dalam interferensi pentosan pada agregasi gluten. Hal ini mendorong induksi ikatan disulfida dengan bantuan PROT, sehingga menyebabkan fenomena koalesensi	Interaksi TG, AMYL, XYL dan PROT berpengaruh terhadap viskoelastisitas adonan. AMYL, XYL dan PROT menurunkan semua <i>dynamic moduli</i> . XYL dan TG mencegah penguatan adonan yang berlebihan. TG mengurangi volume spesifik roti dan menyebabkan remah halus. AMYL, XYL dan PROT mempunyai pengaruh <i>antistaling</i> didukung oleh TG. Kombinasi sinergis GO dan PROT meningkatkan rasio tinggi terhadap lebar pada volume spesifik roti. GO menambah jumlah adonan yang dihasilkan dalam pembuatan roti dengan meningkatkan rasio tinggi terhadap lebar. Karakteristik remah lebih elastis dan kompak. Enzim yang berperan terhadap degradasi polisakarida dan PROT menghasilkan bentuk roti yang lebih baik dan volume spesifik tinggi	Roti dari tepung gandum	Caballerro et al, 2007

	sel gas pada struktur sel remah roti.	memberikan pengaruh positif terhadap parameter kualitas roti. LAC dan XYL menimbulkan pengaruh signifikan pada kecerahan remah, kepadatan dan ketebalan dinding pada struktur sel remah roti.		
--	---------------------------------------	---	--	--

Tabel 3. Sinergisme kombinasi enzim dalam meningkatkan parameter kualitas produk bakery

Enzim	Sumber	Jenis tepung dan produk	Dosis enzim	Parameter kualitas	Referensi
Laccase; Xylanase	Xylanase (Pentopan Mono BG, Novozyme); Laccase dari jamur <i>white-rot Trametes hirsute</i> yang dipurifikasi sebagian dengan <i>anion exchange chromatography</i> .	51% tepung oat dan 49% tepung gandum, produk roti	Xylanase (132,600 nkat/g; 20 nkat/g tepung) and laccase (7800 nkat/mL; 14 nkat/g tepung)	Meningkatkan volume roti oat, spesifik volume roti oat-gandum, melembutkan adonan dan roti, memberi keuntungan pada tekstur roti oat and oat-gandum	Flander et al, 2008
α -amilase; lipase	Maltogenic amilase NM15; Maltogenic amilase-lipase Prozyme's 3010; Bacterial glucan 1,4- α -maltohydrolase MAX LIFE P15; Bacterial α -amilase VERON x Tender;	Tepung gandum durum, produk roti	NM15 80g/100g formulasi; Prozyme's 3010 70g/100g formulasi; MAX LIFE P15 80g/100g formulasi; VERON x Tender 55g/100g formulasi;	Menghasilkan roti yang lembut and mudah dikunyah, memperlambat perubahan tekstur menjadi keras dan kenyal selama penyimpanan, perbedaan morfologi pori pada remah roti dibandingkan kontrol, <i>antistaling</i> dan memperlambat <i>staling</i>	Giannone et al, 2016

	Fungal α -amilase VERON MAC.		VERON MAC 55g/100g formulasi.		
Amilase; Xylanase	Bacterial α -amilase dari Bacillus subtilis and fungal α -amilase dari Aspergillus oryzae, didapatkan dari Sigma-Aldrich; Xylanase dari Humicola insolens didapatkan dalam bentuk kering dari Novozyme	Tepung gandum utuh, Produk Chapati	Bacterial α -amilase, 10.49 U; fungal α -amylase, 8.326 U; xylanase, 25.12 U dilarutkan dalam air dan dicampur dengan 200 g tepung gandum utuh.	Keseragaman granula pati, mempertahankan kelenturan chapati pada penyimpanan, <i>aftertaste</i> manis dan meningkatkan <i>mouthfeel</i>	Hemalatha et al, 2014
Glucose oxidase; Xylanase; Amilase	Fungal α -amilase, Glucose oxidase; Xylanase berasal dari Aspergillus oryzae	Roti dari tepung gandum	Dosis optimal amilase, glucose oxidase and xylanase berturut-turut 5, 30 dan 20 ppm.	Resistensi adonan yang baik, meningkatkan penyerapan air, stabilitas adonan, meningkatkan <i>development time</i> dan spesifik volume, bentuk lebih baik dan simetris, memperbaiki tekstur roti.	Shafisoltani et al, 2014
Amilase; Xylanase; Cellulase	α -amilase dari fungamyl 2500 SG 3.2.1.1 (2–10 ppm), xylanase dari Pentopan Mono BG 3.2.1.8 (20–120 ppm) dan cellulase from cellulast BG 3.2.1.4 (10–60 ppm)	Tepung gandum disubstitusi dengan 15% wheat bran	α -amilase (6 dan 10 ppm), xylanase (70 dan 120 ppm) dan cellulase (35 dan 60 ppm)	Kombinasi enzim α -amilase, xylanase dan cellulase (6, 120 dan 60 ppm) meningkatkan ekstensibilitas adonan sampai 42%. Nilai maksimum (31.2) Mixing Tolerance Index (MTI) adonan dihasilkan dengan	Liu et al, 2017

				<p>konsentrasi α-amilase, xylanase dan cellulose: 10, 70 dan 35 ppm. Nilai maksimum stabilitas adonan dihasilkan dengan konsentrasi α-amilase dan cellulose; 6 ppm and 60 ppm. Single dan kombinasi enzim dapat meningkatkan ekstensibilitas, kelembutan, MTI dan kelengketan adonan; menurunkan ketahanan terhadap ekstensi. Secara khusus, kombinasi enzim α-amilase, xylanase dan cellulase meningkatkan ekstensibilitas, kelembutan, MTI dan kelengketan adonan ke nilai yang lebih tinggi dibanding <i>single</i> enzim.</p>	
α -amilase; hemiselulosa	α -amilase dan hemiselulosa (IBIS Yellow Clean Label) diproduksi oleh Lesffre Co., Ltd. (Marcq-en-Baroeulnjo, France)	Roti tepung gandum dengan perlakuan tekanan tinggi	Adonan roti disiapkan pada kondisi yang optimal: penambahan 0.20% bakeri enzim berdasarkan jumlah tepung dan	Perlakuan tekanan tinggi meningkatkan aktivitas enzim (degradasi pati yang rusak dan hemiselulosa terutama pentosan tidak larut, menjadi sakarida larut dengan berat molekul rendah), menghasilkan	Matsushita et al, 2019

			tekanan 43 MPa dalam waktu 10 menit pada suhu 20°C	pembentukan jaringan gluten dan sifat adonan yang diharapkan. Kombinasi enzim dan tekanan tinggi meningkatkan retensi gas pada adonan dan spesifik volume, pengembangan jaringan gluten dan memperlambat tingkat <i>staling</i> roti selama penyimpanan. Selain itu terjadi peningkatan maltosa, gula reduksi dan kandungan gula total dalam adonan.	
α -amilase; xylanase	endo- β -1,4-xylanase (Pentopan 500 BG) dan fungal α -amilase (Fungamyl 2500 SG)	Tepung gandum, produk roti	α -amilase dan xylanase 100 ppm	Penurunan kekerasan dan kekenyalan remah, meningkatkan spesifik volume, menghambat roti menjadi keras	Kim dan Yoo, 2020
Transglutaminase; Xylanase	Kombinasi xylanase dan transglutaminase (VERON HF diperoleh dari kultur spesifik <i>Aspergillus niger</i> , IUB-No.: 3.2.1.8	Tepung dengan campuran 50% gandum dan 50% proso millet, produk roti	0.015 g/100 g tepung.	Meningkatkan volume roti sampai 25%. Xylanase mendukung efek melembutkan remah dari penambahan transglutaminase, penurunan signifikan pada sifat liat, kekerasan dan kekenyalan	Schoenlechner et al, 2013
Xylanase; Glucose oxidase	Xylanase (Pentopan Mono BG,	Tepung gandum utuh,	Xylanase (2500 U/g; 800 ppm,	Kombinasi xylanase dan glucose oxidase	Yang et al, 2021

	endo- β -1, 4-xylanase) dari <i>Aspergillus oryzae</i> . Glucose oxidase dari <i>Aspergillus niger</i> .	produk roti	2400 ppm) dan GOX (10,000 U/g; 40, 80 ppm)	meningkatkan elastisitas dan viskositas. Namun, peningkatan xylanase memicu penurunan elastisitas dan viskositas.	
Fungal amylase (AMY-F); Bacterial amylase (AMY-B); Maltogenic α -amylase (AMY-M); Fungal xylanase (XYL-F); Bacterial xylanase (XYL-B); Glucose oxidase (GOX); Laccase (LAC); Lipase (LIP); Transglutaminase (TG)	Fungal α -amylase Veron M4 dari <i>Aspergillus oryzae</i> (AB Enzymes), bacterial α -amylase Spring Alfa Bac 7500 dari <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Granolab), maltogenic α -amylase Veron Mac dari <i>Bacillus stearothermophilus</i> (AB Enzymes), fungal xylanase Veron 191S dari <i>Aspergillus niger</i> (AB Enzymes), bacterial xylanase Veron RL dari <i>Bacillus subtilis</i> (AB Enzymes), glucose oxidase Spring Gluz dari <i>B. subtilis</i> (Granolab), laccase Novoprime Base 268 dari	Tepung A dengan parameter design untuk baking dan tepung B dengan parameter design untuk biskuit	Optimasi enzim pada adonan tepung A dengan kombinasi: AMY-B (166 U/kg), AMY-M (133 U/kg), XYL-B (150 U/kg), GOX (8 U/kg) dan LIP (150 U/kg) Optimasi enzim pada adonan tepung B dengan kombinasi: AMY-B (150 U/kg), LIP (150 U/kg), GOX (100 U/kg), dan LAC (200 U/kg)	Kombinasi XYL-B dan GOX menunjukkan efek sinergis dengan meningkatkan nilai W (10–4 J) dan rasio P/L. Kombinasi GOX dan LAC menunjukkan pengaruh kooperatif jika digunakan dengan konsentrasi yang berlawanan. Kombinasi LIP dengan enzim lainnya berpengaruh terhadap penurunan <i>development time</i> dan meningkatkan nilai W. Kombinasi AMY-B dan AMY-M merupakan pilihan yang bagus untuk memperbaiki nilai falling number. Interaksi XYL-B/GOX menyeimbangkan antara elastisitas dan ekstensibilitas. Kombinasi nilai W yang rendah dan nilai rasio P/L	Bueno et al, 2016

	Aspergillus oryzae (Novozymes), lipase Enzymill FL dari Humicola spp. (Vallens Food Ingredients), and transglutaminase Veron TG dari Streptovercillum mobarense (AB Enzymes)			yang tinggi menunjukkan karakteristik adonan yang kuat.	
--	--	--	--	---	--

3. OPTIMASI KOMBINASI ENZIM PADA PRODUK BAKERY

Parameter kualitas proses maupun produk dapat dipertahankan dengan penambahan kombinasi enzim yang tepat dari segi rasio, jumlah, jenis dan pemilihan waktu pencampuran dengan ingredien lain. Hal tersebut dapat meningkatkan efektivitas kerja enzim, menghindari kesalahan yang berlebihan selama tahapan pengolahan berlangsung dan menekan biaya produksi. Beberapa pertimbangan yang perlu diperhatikan adalah (i) banyaknya variabel yang berpengaruh terhadap proses pengolahan (ii) interaksi antar variabel pada matriks pangan (iii) validasi dan verifikasi variabel yang terlibat untuk menentukan variabel kritis. Response Surface Method (RSM) merupakan pemodelan optimasi yang paling efektif dan efisien sebagai jawaban atas pertimbangan-pertimbangan tersebut. Penggunaan RSM pada optimasi kombinasi enzim dan proses pengolahan pada industri bakeri dapat membantu pengambilan keputusan dengan memahami dan mendeskripsikan proses melalui hubungan kuantitatif antara variabel input dan output.

RSM merupakan kumpulan teknik statistik dan matematis yang bermanfaat dalam pengembangan, peningkatan dan optimasi proses, di mana respon yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti variabel independen. Metode ini juga penting diaplikasikan pada design dan formulasi produk baru maupun peningkatan design produk yang sudah ada. Kelebihan utama RSM antara lain dapat memfasilitasi input banyak variabel yang dapat berpengaruh pada proses dan karakteristik produk. Selain itu, RSM menghasilkan informasi dalam jumlah besar dari pengurangan jumlah percobaan yang diperlukan untuk mengevaluasi beberapa parameter dan interaksinya. Prosedur dan pemodelan RSM melalui beberapa tahapan meliputi (1) identifikasi variabel independen dan tingkatannya (2) pemilihan design eksperimental (3) pemilihan model regresi, prediksi dan verifikasi model persamaan (4) presentasi grafis dari model persamaan (5) prediksi dan penentuan kondisi optimal proses. *Design screening* diperlukan untuk mengidentifikasi variabel kritis yang berpengaruh terhadap proses pengolahan pangan seperti resep/ingredien dan parameter proses. *Design screening* seperti *Plackett-Burman* dan *Saturated fractional factorial design* biasa digunakan pada formulasi dan pengolahan pangan (Kidane, 2021).

Identifikasi signifikasi variabel independen dan pemilihan parameter kualitas yang relevan (respon) akan dilanjutkan dengan memilih design eksperimen yang sesuai dalam pengembangan produk pangan secara statistik. Design eksperimen yang biasa digunakan pada RSM antara lain *3ⁿ factorial*, *central composite design (CCD)*, *Box-Behnken Design (BBD)*, *D-optimal designs (constrained designs)* dan *mixture design*. Desain ini dibedakan berdasarkan pemilihan titik eksperimen, jumlah tingkatan untuk variabel serta jumlah *run* dan *block*. CCD merupakan dasar dari RSM dan populer digunakan untuk memperkirakan parameter dari *full second degree* model pada

penelitian ilmiah. Keuntungan CCD dari segi efisiensi yaitu hanya memerlukan jumlah *runs* yang sedikit untuk setiap faktor yang mempunyai 3/5 level. Keuntungan yang lain adalah dapat dibangun dalam *sequential* eksperimen program dengan informasi yang dikumpulkan sebelumnya dari design *2ⁿ factorial*. Jika model linier dari *2ⁿ factorial* tidak signifikan maka dapat mendesign trial lain berdasarkan prinsip CCD untuk memperbaiki model tersebut. Semua data ini akan digunakan untuk membangun model *quadratic* yang juga dikenal dengan prinsip build-up CCD. Model *quadratic* memenuhi kebutuhan akurasi dari pemodelan pengembangan produk dan proses (Kidane, 2021). Aplikasi RSM pada optimasi enzim dan proses pengolahan produk bakeri dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Aplikasi RSM Pada Optimasi Enzim dan Proses Pengolahan Produk Bakery

Topik	Variabel independen	Respon	Experimental design	Referensi
Optimasi formulasi roti bebas gluten dengan bahan dasar tepung quinoa	Tepung quinoa, xanthan gum dan laccase	Kandungan total aflatoxin (TAF) dan aflatoxin B1 (AFB1), indikator warna (L^* , a^* , and b^*) dan tekstur (<i>hardness</i> , <i>cohesiveness</i> , dan <i>springiness</i>)	Central composite design	Alizadeh-Bahaabadi et al, 2022
Pengaruh penambahan enzim pada kualitas roti <i>frozen prebaked French</i> dengan substitusi tepung gandum utuh	Glucolipase, hemicellulase dan hexose oxidase	Parameter proses (<i>high-speed mixing</i> dan waktu <i>proofing</i>) dan karakteristik kualitas roti (spesifik volume, tekstur remah, <i>oven spring</i> , <i>shape</i> , <i>cut opening</i> dan <i>cut height</i>).	Central composite rotational design	Almeida dan Chang, 2012
Optimasi formulasi roti bebas gluten dengan bahan dasar tepung beras, pati kentang dan susu bubuk skim	HPMC dan penambahan air	Spesifik volume, tinggi roti, karakteristik <i>crumb</i> dan <i>crust</i> , parameter <i>crumb grain</i>	Central composite design	McCarthy et al, 2005
Optimasi ingredien dan proses <i>baking</i> untuk meningkatkan kualitas roti <i>wholemeal oat</i>	Kandungan gluten dan air, waktu <i>mixing</i> adonan, suhu dan waktu <i>proofing</i> , kondisi baking	Spesifik volume, instrumental <i>crumb hardness</i> dan sensoris tekstur, <i>mouthfeel</i> dan <i>flavour</i>	Central composite face centered design	Flander et al, 2007
Peningkatan adonan roti dengan penambahan <i>crust</i>	α -amylase (AM) dan hemicellulase (HC)	Kualitas pengolahan roti meliputi spesifik volume roti, retensi	Central composite face centered design	Goshima et al, 2019

gel dan enzim untuk bakeri		gas adonan, <i>staling</i> adonan dan roti pada penambahan <i>crust</i> gel, evaluasi sensoris		
Optimasi kombinasi enzim untuk meningkatkan kualitas dan keberterimaan konsumen roti.	Transglutaminase (TGase), L-ascorbic acid (L-AA), dan xylanase (Xyl)	<i>Peak time</i> , toleransi <i>mixing</i> , ekstensibilitas, resistensi, spesifik volume, <i>hardness</i> dan keberterimaan konsumen	Box-Behnken design	Kim dan Kim, 2016
Pengaruh <i>Aspergillus tubingensis</i> glucose oxidase, asam askorbat dan α -amilase pada sifat adonan, kualitas baking dan masa simpan roti.	<i>Aspergillus tubingensis</i> glucose oxidase, asam askorbat dan α -amilase	Sifat adonan (W index, P/L, Ie, <i>hardness</i> (N), <i>chewiness</i> (Nmm), kohesi dan adesi (N), kualitas roti (<i>hardness</i> , <i>chewiness</i> (Nmm), <i>springiness</i> (mm) and kohesi)	Simplex-centroid mixture design	Kriaa et al, 2015
Pengaruh kombinasi enzim terhadap sifat reologi adonan <i>Chinese steam bread</i> diperkaya <i>wheat bran</i>	cellulase, xylanase dan α -amilase	Sifat <i>mixing</i> , pembentangan adonan, kelengketan adonan.	Full factorial designs	Liu et al, 2017
Pengaruh kombinasi enzim bakeri dan perlakuan tekanan tinggi pada kualitas pengolahan roti	α -amilase, hemicellulose, perlakuan tekanan tinggi pada adonan	Kekuatan dan retensi gas pada adonan, spesifik volume, warna <i>crust</i> roti, struktur <i>crumb</i> dan <i>hardness</i> roti	Central composite face-centered design	Matsushita et al, 2019
Optimasi penambahan enzim untuk meningkatkan kualitas pengolahan roti gandum utuh	α -amilase (AM) dan hemicellulase (HC)	Retensi gas pada adonan, spesifik volume dan <i>staling</i> roti	Central composite face-centered design	Matsushita et al, 2019
Optimasi kombinasi <i>Aspergillus oryzae</i> S2 α -amylase, asam askorbat dan glucose oxidase	<i>Aspergillus oryzae</i> S2 α -amylase (Amy), asam askorbat (Asc) dan glucose oxidase (GOD)	W indeks, elastisitas indeks, P/L, <i>chewiness</i> adonan (Nmm), kohesivitas roti,	Simplex-centroid experimental design	Sahnoun et al, 2016

untuk meningkatkan sifat adonan dan kualitas roti		spesifik volume, evaluasi sensoris		
Pengaruh perlakuan enzimatis pada kualitas tepung roti	Glucose oxidase, xylanase, α -amilase	spesifik volume, bentuk, tekstur dan atribut sensoris	Central Composite Rotational Design	Shafisoltani et al, 2014
Menekan pembentukan akrilamida selama pemanggangan roti dengan penambahan asparaginase, waktu dan suhu baking menggunakan RSM	Suhu baking, waktu baking dan konsentrasi asparaginase	Konsentrasi akrilamida	Central composite design	Matouri dan Alemzadeh, 2018
Pengaruh kombinasi mikrobal enzim pada reologi adonan tepung gandum	Fungal amilase, bacterial amilase, maltogenic α -amilase; fungal xylanase; bacterial xylanase; glucose oxidase; laccase; lipase; transglutaminase	Parameter reologi adonan: falling number, penyerapan air, <i>development time</i> , <i>stability time</i> , nilai W dan rasio P/L	Plackett-Burman diikuti dengan Full factorial designs	Bueno et al, 2016

4. REGULASI PENGGUNAAN ENZIM PANGAN DI US, EU, DAN INDONESIA

Proses pengolahan dalam industri pangan menggunakan enzim untuk meningkatkan sifat fungsional dan mendapatkan karakteristik produk yang diinginkan. Hal – hal yang perlu diperhatikan dalam penggunaan enzim pangan antara lain tipe enzim, mekanisme kerja dan kondisi sistem pangan yang dapat berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Penggunaan enzim pangan juga mempertimbangkan tujuan aplikasi enzim tersebut sebagai *processing aid* atau *food additive*. Definisi umum antara enzim sebagai *processing aid* maupun *food additive* belum ditetapkan secara resmi. Terdapat perbedaan penentuan regulasi pada enzim pangan antara European Union (EU) dan United State (US). EU memisahkan regulasi antara enzim pangan dengan *food additive* sedangkan US mempertimbangkan enzim pangan merupakan subgroup dari *food additive*. Penetapan keseragaman regulasi harus memastikan keberlangsungan produksi dan konsumsi pangan yang sehat dan aman. Penilaian untuk menentukan status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) dikeluarkan oleh FDA (*Food and Drug Administration*), US sedangkan status QPS (*Qualified Presumption of Safety*) dikeluarkan oleh EFSA (*European Food Safety and Authority*), EU (Kocabas dan Grumet, 2019). Regulasi untuk memastikan penanganan yang aman dari enzim pangan dapat dilihat pada FIAP (*Food Improvement Agent Package*). FIAP bertujuan untuk mencapai keseragaman undang-undang Eropa tentang aditif, termasuk persetujuan prosedur keseragaman (EC 1331/2008). Otoritas prosedur untuk mengatur dan memperbarui daftar komunitas untuk *food additive*, *food enzyme* dan *food flavoring* dirumuskan dalam regulasi (EC) no 1331/2008 untuk menjamin kesehatan dan kesejahteraan konsumen. Kerangka spesifik regulasi (EC) 1332/2008 untuk *food enzyme*, EC 1333/2008 untuk *food additive* dan EC 1334 untuk *food flavoring*. Upaya untuk memenuhi kebutuhan dan memastikan

perlindungan konsumen yang komprehensif dilakukan melalui prosedur spesifik dalam evaluasi enzim yang ditetapkan FIAP (Popper dan Losche, 2021).

US mendefinisikan enzim pangan sebagai *food additive* yang digunakan untuk meningkatkan proses pangan dan kualitas produk akhir. EU mendefinisikan enzim pangan sebagai produk yang diperoleh dari tanaman, hewan atau mikroorganisme atau produk daripadanya termasuk produk yang diperoleh dari fermentasi menggunakan mikroorganismenya yang (i) mengandung satu atau lebih enzim yang dapat mengkatalisis reaksi biokimia yang spesifik (ii) yang ditambahkan pada makanan untuk tujuan teknologi selama produksi, proses, preparasi, perlakuan, pengemasan, transportasi maupun penyimpanan makanan. Informasi yang berkaitan dengan keamanan produk yang digunakan untuk penilaian didokumentasikan oleh EFSA dalam *Guidance on the Submission of a Dossier on Food Enzymes for Safety Evaluation*. Peraturan (EC) No 1332/2008 menyatakan bahwa enzim pangan sesuai dengan QPS tunduk pada kewajiban pelabelan umum sehubungan dengan ketertelusuran dan pelabelan organisme hasil rekayasa genetika (GMO), ketertelusuran dan produk pangan yang dihasilkan dari organisme hasil rekayasa genetika. Dalam label, enzim pangan harus ditandai dengan fungsi teknologinya dalam makanan, diikuti dengan nama spesifik enzim pangan. Pelabelan harus mudah terlihat, terbaca dengan jelas dan tidak mudah dihapus (Kocabas dan Grumet, 2019; Popper dan Losche, 2021).

Penggunaan bahan penolong golongan enzim di Indonesia diatur dalam peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Nomor 28 tahun 2019. Berdasarkan peraturan tersebut, enzim adalah protein yang dihasilkan sel hidup (mikroba, tanaman, atau hewan) yang dapat mengkatalisis reaksi kimia spesifik yang digunakan untuk tujuan teknologi tertentu dalam proses pengolahan pangan. Bahan Penolong adalah bahan, tidak termasuk peralatan, yang lazimnya tidak dikonsumsi sebagai pangan, yang digunakan dalam pengolahan pangan untuk memenuhi tujuan teknologi tertentu dan tidak meninggalkan residu pada produk akhir, tetapi apabila tidak mungkin dihindari, residu dan/atau turunannya dalam produk akhir tidak menimbulkan resiko terhadap kesehatan serta tidak mempunyai fungsi teknologi. Bahan penolong yang digunakan dalam proses pengolahan pangan harus digunakan seminimum mungkin untuk mencapai efek yang diinginkan dan ada upaya penghilangan residu dan/atau inaktivasi pada akhir proses pengolahan pangan. Batas maksimal penggunaan enzim sebagai bahan penolong diatur dengan Cara Produksi Pangan yang Baik (CPPB) yang selanjutnya disebut Batas Maksimal Penggunaan CPPB. Batas Maksimal Penggunaan CPPB adalah konsentrasi bahan penolong secukupnya digunakan dalam pangan untuk menghasilkan efek teknologi yang diinginkan (BPOM, 2019). Perbedaan regulasi penggunaan enzim pangan US, EU dan Indonesia dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Perbedaan regulasi penggunaan enzim pangan US, EU dan Indonesia

Negara	US	EU	Indonesia
Badan regulasi	USDA (FDA)	EFSA	BPOM
Regulasi	CFR Title 21 (Part 170)	EC No 1332/2008	Peraturan BPOM No. 28 Tahun 2019
Tanggal regulasi	15 Maret 1977 (Revisi tahunan)	16 Desember 2008	17 Oktober 2019
Definisi enzim pangan	Enzim merupakan <i>food additive</i> yang digunakan untuk meningkatkan proses pangan dan kualitas produk akhir	Enzim pangan sebagai produk yang diperoleh dari tanaman, hewan atau mikroorganisme atau produk daripadanya termasuk produk yang diperoleh dari fermentasi	Enzim adalah protein yang dihasilkan sel hidup (mikroba, tanaman, atau hewan) yang dapat mengkatalisis reaksi kimia spesifik yang digunakan untuk tujuan teknologi

		menggunakan mikroorganismen	tertentu dalam proses pengolahan pangan.
Asumsi keamanan berdasarkan penggunaan secara umum/bukti yang beralasan	GRAS	QPS	CPPB

Sesuai dengan Tabel 5, Indonesia dan EU memisahkan regulasi penggunaan enzim sebagai bahan tambahan pangan dan bahan penolong. Regulasi ini membantu industri pangan untuk mengaplikasikan enzim dengan tujuan tertentu pada tahapan proses sehingga memberikan pengaruh fungsional yang spesifik. Enzim sebagai bahan penolong dapat diaplikasikan pada semua kategori pangan dengan batas maksimal penggunaan CPPB. Hal tersebut berkaitan dengan denaturasi pada proses baking sehingga enzim tidak aktif pada produk akhir bakeri. Dengan demikian, enzim secara spesifik bekerja pada tahapan proses sebelum *baking* dan tidak terdapat residu pada produk akhir, sesuai dengan ketentuan regulasi BPOM. Maka dari itu, kesesuaian antara pemilihan enzim pangan (spesifikasi dan karakteristik, parameter tahapan proses dan regulasi enzim pangan) diperlukan untuk menghasilkan produk bakeri yang aman bagi konsumen.

5. KESIMPULAN

Perkembangan teknologi yang berkesinambungan dimanfaatkan industri bakeri untuk meningkatkan kualitas mulai dari ingredien, resep/formulasi, proses pengolahan sampai dengan penanganan produk akhir. Penggunaan kombinasi enzim dan metode pengolahan merupakan salah satu alternatif untuk meningkatkan kualitas dengan cara yang efektif dan efisien. Kombinasi enzim memberikan efek sinergis maupun antagonis tergantung dari jenis dan mekanisme kerja antara satu enzim dengan enzim lain yang saling mempengaruhi. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap parameter proses pengolahan bakeri juga perlu dipertimbangkan untuk menciptakan efek sinergis pada kombinasi enzim. Parameter proses tersebut berkaitan dengan kondisi pada tahapan mixing, fermentasi dan *baking*. Kesesuaian antara parameter proses, spesifikasi dan karakteristik enzim memberikan hasil yang signifikan terhadap optimasi penggunaan kombinasi enzim dalam proses pengolahan bakeri. Kombinasi enzim dapat diaplikasikan dengan memanfaatkan peran enzim sebagai *processing aid*. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa enzim sebagai *processing aid* lebih bekerja secara maksimal dalam bentuk kombinasi enzim dibandingkan dengan *single* enzim.

Pemahaman peran enzim dalam sistem pangan sangat diperlukan dalam pemilihan enzim yang akan dikombinasikan baik dari kelas enzim yang sama maupun kelas enzim yang berbeda. Hal ini membantu peneliti dan pengembang untuk melakukan optimasi kombinasi enzim dengan mempertimbangkan kondisi tahapan proses pada pengolahan bakeri. Response Surface Method (RSM) merupakan salah satu metode yang digunakan secara luas dan efektif untuk memodelkan dan mengoptimalkan proses pengolahan pangan. Efektifitas dan efisiensi RSM ditunjukkan pada pengurangan jumlah percobaan yang diperlukan untuk mengevaluasi beberapa parameter dan interaksinya hingga menghasilkan banyak informasi. Penggunaan metode ini pada kombinasi enzim dan proses pengolahan menunjukkan hasil yang valid dengan mengikuti prosedur dan design eksperimen yang tepat. Central composite design (CCD) merupakan salah satu design eksperimen RSM yang paling efisien dikarenakan hanya memerlukan jumlah *runs* yang sedikit untuk setiap faktor yang mempunyai 3/5 level. CCD menggunakan prinsip *build-up* untuk membangun model *quadratic* menggunakan informasi yang dikumpulkan dari design 2^n factorial. Jika model linier dari 2^n factorial tidak signifikan maka dapat mendesign trial lain berdasarkan prinsip CCD untuk memperbaiki model tersebut. Perbaikan model dengan prinsip *building-up* sangat sesuai dengan tuntutan industri pangan

yang memerlukan validasi dan verifikasi cepat, tepat dan akurat dalam pengambilan keputusan dalam hal pengembangan produk maupun proses produksi.

Pengembangan produk dan proses produksi melalui aplikasi enzim pangan diharapkan menghasilkan produk yang aman dikonsumsi dan dapat memenuhi karakteristik produk dengan kualitas yang diterima di pasaran. Regulasi penggunaan enzim pada produk pangan diatur beberapa negara termasuk didalamnya United State (US), Europe Union (EU), dan Indonesia. US mempertimbangkan enzim pangan dalam subgroup dari *food additive* yang diatur oleh FDA. EU memisahkan regulasi antara enzim pangan dengan *food additive* yang diatur oleh EFSA. Indonesia mengkategorikan penggunaan enzim sebagai bahan penolong yang diatur oleh BPOM. Indonesia dan EU memisahkan regulasi penggunaan enzim sebagai bahan tambahan pangan dan bahan penolong. Penerapan regulasi tersebut mendorong industri pangan untuk mengaplikasikan enzim pangan sesuai dengan aturan yang berlaku sehingga masyarakat merasa aman ketika mengkonsumsi semua kategori produk pangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abedi, E., Pourmohammadi, K. dan Sayadi, M. 2022. Synergic effect of phytase, amylase, galactosidase, and asparaginase activity on the mitigation of acrylamide and hydroxymethylfurfural in roll bread by co-culture fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*. 106: 104355.
- Alaunyte, I., Valentina, S., Plunkett, A., Ainsworth, P. dan Derbyshire, E. 2012. Improving the quality of nutrient-rich Teff (*Eragrostis tef*) breads by combination of enzymes in straight dough and sourdough breadmaking. *Journal of Cereal Science*. 55: 22-30.
- Alizadeh-Bahaabadi, G., Lakzadeh, L., Forootanfar, H., dan Akhavan, H. 2022. Optimization of gluten-free bread production with low aflatoxin level based on quinoa flour containing xanthan gum and laccase enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*. 200: 61–76.
- Almeida, E.L. dan Chang, Y.K. 2012. Effect of the addition of enzymes on the quality of frozen pre-baked French bread substituted with whole wheat flour. *LWT - Food Science and Technology*. 49: 64-72.
- Baratto, C.M., Becker, N.B., Gelinski, J.M.L.N. dan Silveira, S.M. 2015. Influence of enzymes and ascorbic acid on dough rheology and wheat bread quality. *Afr. J. Biotechnol.*, 15(3): 55-61.
- BPOM RI., 2019. Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan Nomor 28 Tahun 2019 Tentang Bahan Penolong Dalam Pengolahan Pangan. Jakarta: BPOM.
- Bueno, M.M., Thys, R.C.S. dan Rodrigues, R.C. 2016. Microbial Enzymes as Substitutes of Chemical Additives in Baking Wheat Flour—Part II: Combined Effects of Nine Enzymes on Dough Rheology. *Food Bioprocess Technol.*
- Caballero, P.A., Gomez, M. dan Rosell, C.M. 2007. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *Journal of Food Engineering*. 81: 42-53.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Corsetti, A., Lavermicocci, P., Arnault, P., Tossuti, P., Gallo, G., dan Gobbetti, M. 2003. Interactions between sourdough lactic acid bacteria and exogenous enzymes: effects on the microbial kinetics of acidification and dough textural properties. *Food Microbiology*. 20: 67–75.
- Flander, L., Salmenkallio-Marttila, M., Suortti, T. dan Autio, K. 2007. Optimization of ingredients and baking process for improved wholemeal oat bread quality. *LWT*. 40: 860–870.
- Flander, L., Rouau, X., Morel, M., Autio, K., Seppanen-Laakso, T., Kruus, K. dan Buchert, J. 2008. Effects of Laccase and Xylanase on the Chemical and Rheological Properties of Oat and Wheat Doughs. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 5732–5742.

- Giannone, V., Lauro, M.R., Spina, A., Pasqualone, A., Auditore, L., Puglisi, I., dan Puglisi, G. 2016. A novel α -amylase-lipase formulation as anti – staling agent in durum wheat bread. *LWT - Food Science and Technology*, 65: 381-389.
- Goshima, D., Matsushita, K., Iwata, J., Nakamura, T., Takata, K. dan Yamauchi, H. 2019. Improvement of Bread Dough Supplemented with Crust Gel and the Addition of Optimal Amounts of Bakery Enzymes. *Food Science and Technology Research*. 25 (5): 625-636.
- Hemalathaa, M.S., Leelavathib, K., Salimatha, P.V. dan Prasada Rao, U.J.S. 2014. Control of chapati staling upon treatment of dough with amylases and xylanase. *Food Bioscience*, 5: 73–84.
- Kidane, S.W. 2021. *Application of Response Surface Methodology in Food Process Modeling and Optimization*. In Response Surface Methodology in Engineering Science. Palanikumar, K. Intech, chapter 13.
- Kim, M.J. dan Kim, S.S. 2016. Determination of the Optimum Mixture of Transglutaminase, L-Ascorbic Acid and Xylanase for the Quality and Consumer Acceptability of Bread using Response Surface Methodology. *Food Sci. Biotechnol.* 25(S): 77-84.
- Kim, H. dan Yoo, S. 2020. Effects of Combined α -Amylase and Endo-Xylanase Treatments on the Properties of Fresh and Frozen Doughs and Final Breads. *Polymers*. 12: 1349.
- Kocabas, D.S. dan Grumet, R. 2019. Evolving regulatory policies regarding food enzymes produced by recombinant microorganisms. *GM Crops & Food*. 10: 191–207.
- Kriaa, M., Ouhibi, R., Graba, H., Besbes, S., Jardak, M. dan Kammoun, R. 2015. Synergistic effect of *Aspergillus tubingensis* CTM 507 glucose oxidase in presence of ascorbic acid and alpha amylase on dough properties, baking quality and shelf life of bread. *J Food Sci Technol*.
- Liu, W., Brennan, M.A., Serventi, L., dan Brennan, C.S. 2017. Effect of cellulase, xylanase and α -amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran. *Food Chemistry*. 234: 93–102.
- Matouri, M. dan Alemzadeh, I. 2018. Suppressed acrylamide formation during baking in yeast-leavened bread based on added asparaginase, baking time and temperature using response surface methodology. *Applied Food Biotechnology*. 5 (1): 29-36.
- Matsushita, K., Tamura, A., Goshima, D., Santiago, D.M., Myoda, T., Takata, K., dan Yamauchi, H. 2019. Effect of combining additional bakery enzymes and high pressure treatment on bread making qualities. *J Food Sci Technol*.
- Matsushita, K., Tamura, A., Goshima, D., Santiago, D.M., Myoda, T., Takata, K., dan Yamauchi, H. 2019. Optimization of enzymes addition to improve whole wheat bread making quality by response surface methodology and optimization technique. *J Food Sci Technol*, 56(3): 1454–1461.
- McCarthy, D. F., Gallagher, E., Gormley, T.R., Schober, T.J. dan Arendt, E.K. 2005. Application of Response Surface Methodology in the Development of Gluten Free Bread. *Cereal Chem.*, 82(5): 609–615.
- Miguel, A.S.M., da Costa F.E.V, Martins-Meyer, T.S dan Dellamora-Ortiz, G.M. 2013. *Enzymes in Bakery: Current and Future Trends*. In Food Industry. Muzzalo, I (ed.). Intech, 287-321.
- Popper, L. dan Losche, K. 2021. *Understanding Baking Enzymes*. Robert Wenzel. Hamburg, Germany
- Sahnoun, M., Kriaa, M., Besbes, S., Jardak, M., Bejar, S., dan Kammoun, R. 2016. Optimization of *Aspergillus oryzae* S2 α -amylase, ascorbic acid, and glucose oxidase combination for improved French and composite Ukrainian wheat dough properties and bread quality using a mixture design approach. *Food Sci. Biotechnol.* 25(5): 1291-1298.
- Schoenlechner, R., Szatmari, M., Bagdi, A., dan Tomoskozi, S. 2013. Optimisation of bread quality produced from wheat and proso millet (*Panicum miliaceum* L.) by adding emulsifiers, transglutaminase and xylanase. *LWT - Food Science and Technology*. 51: 361-366.

- Shafisoltani, M., Salehifar, M. dan Hashemi, M. 2014. Effects of enzymatic treatment using Response Surface Methodology on the quality of bread flour. *Food Chemistry*, 148: 176–183.
- Yang, M., Yue, Y., Liu, L., Tong, L., Wang, L., Ashraf, J., Li, N., Zhou, X., dan Zhou, S. 2021. Investigation of combined effects of xylanase and glucose oxidase in whole wheat buns making based on reconstituted model dough system. *LWT - Food Science and Technology*, 135: 110261.