اندازه گیری فولات در آرد غنی شده به روش استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی

صدف محرابی [۱]، سید عباس شجاع الساداتی [۲]*، سید محمد موسوی [۳]، مریم هاشمی [۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی و کشاورزی ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۸)

چکیده

فولیک اسید (ویتامین B_9) یکی از ویتامین‌های موردنیاز بدن انسان است که باید به میزان کافی توسط بدن دریافت گردد. از این رو در دو دهه‌ی گذشته، تلاش‌ها برای اندازه گیری دقیق این ویتامین در مواد غذایی افزایش یافته است. چندین روش برای اندازه گیری فولیک اسید وجود دارد که در این پژوهش دو مورد از آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. روش اصلی موردنظر روش استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی این ویتامین بود که به کمک سه آنزیم آلفا آمیلاز، پروتئاز و کانژوگاز و باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسیس* (ATCC ۷۴۶۹) انجام شد. روش دوم که بیشتر به منظور مقایسه با نتایج حاصل از روش اول مورد استفاده قرار گرفت روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بود. نتایج به دست آمده از این پژوهش حاکی از آن بود که روش سنجش میکروبی نسبت به کروماتوگرافی مایع از صحت بالاتری برخوردار است، چرا که میزان به دست آمده برای فولیک اسید به روش میکروبی حدوداً ۵۰ درصد بیشتر از مقداری است که توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد. بخش زیادی از این اختلاف مربوط به استخراج کامل‌تر فولیک اسید که توسط سه آنزیم مذکور انجام شد، برمی‌گردد. با توجه به این پژوهش مشخص شد که روش استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی برای تعیین میزان ویتامین حساس فولیک اسید و همچنین فولات کل موجود در آردهای غنی شده مناسب تر از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به شمار می‌رود.

کلید واژگان: فولیک اسید، استخراج سه آنزیمی، سنجش میکروبی، آرد غنی شده، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

*مسئول مکاتبات: Shoja_sa@modares.ac.ir

۱- مقدمه

واژه‌ی فولات معرف خانواده‌ای از ترکیبات است که فعالیت زیستی تقریباً یکسانی دارند. در حالی که فولات تمام شکل‌های ویتامین‌های این خانواده که به طور طبیعی وجود دارند را در بر می‌گیرد (پلی‌گلوتامات‌ها)، فولیک اسید به شکلی از فولات اطلاق می‌شود که اکسیده، پایدار و به راحتی قابل جذب باشد (مونوگلوتامات). فولیک اسید از لحاظ شکل ظاهری بلور زرد رنگی است که دارای وزن مولکولی ۴۴۱/۴ گرم بر مول است[۱]. امروزه به دلیل مشکلات و بیماری‌های متعددی که سلامتی انسان را تهدید می‌کند توجه به تغذیه‌ی مناسب و اطمینان از سالم و غنی بودن مواد غذایی مورد مصرف جامعه امری مهم و اجتناب ناپذیر تلقی می‌شود. علاوه بر بیماری‌های قلبی عروقی و انواع خاصی از سرطان، کمبود فولیک اسید با بیماری‌های کرون، آلزایمر، افسردگی، پارکینسون و سندرم خستگی مزمن مرتبط می‌باشد[۲]. بسیاری از پژوهشگران مقادیر کم فولیک اسید را با افزایش مقدار هموسیستئین در پلاسمای خون مرتبط می‌دانند که این یک خطر برای افراد مبتلا به بیماری انسداد عروق محسوب می‌شود. فولیک اسید در ساخته شدن گلبول‌های قرمز و سفید مؤثر است، از این‌رو دریافت میزان کافی آن در درمان کم خونی و افزایش ایمنی بدن بسیار مؤثر است [۳].

سلامت تغذیه‌ای و کیفیت نیروی انسانی ارتباط تنگاتنگی با هم دارند لذا همواره بحث امنیت غذایی خانوار از جمله مباحث مهم و مورد توجه برنامه ریزان بهداشتی جهان بوده است. فقر آهن شایع ترین اختلال تغذیه‌ای است که اثرات آن تمامی افراد جامعه به خصوص زنان و کودکان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. امروزه غنی سازی مواد غذایی اصلی و پایه، به عنوان راهکاری اساسی و مؤثر در پیشگیری از اختلالات ناشی از کمبود ریزمغذی‌ها مورد توجه دولت‌ها قرار گرفته است [۴].

سال‌ها است که غنی سازی آرد با فولیک اسید و سایر ریزمغذی‌ها بطور گسترده و در کشورهای صنعتی انجام می‌شود و مشخص شده که این روش، ایمن، پایدار و بی‌خطر بوده و مورد استقبال مصرف کنندگان قرار می‌گیرد. دلیل انتخاب آرد برای انجام غنی سازی آن است که نان قوت اصلی و روزانه افراد جامعه می‌باشد بنابراین می‌تواند حامل مناسبی برای ریزمغذی‌های موردنیاز بدن باشد چرا که از دسترسی بالایی بین عموم مردم برخوردار است. غنی سازی غلات و حبوبات به مقدار ۱۴۰ میکروگرم فولیک اسید به ازای هر ۱۰۰ گرم از ماده غذایی در سال ۱۹۹۲ میلادی توسط دولت فدرال امریکا گواهی بر اهمیت این مسئله است. هدف از این تصمیم کاهش خطر بیماری‌های قلبی و خطر تولد کودکان مبتلا به نقایص مجرای عصبی و شکاف کام بود. طی این قانون زنانی که در سن باروری بودند ملزم به مصرف ۴۰۰ میکروگرم فولیک اسید در روز شدند [۵].

به دلیل اهمیت زیاد فولات در سلامتی، نیاز به توسعه و بهینه سازی روش‌هایی که قادر به اندازه‌گیری دقیق میزان فولات در مواد غذایی باشند ضروری به نظر می‌رسد. امروزه روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری فولات به کار می‌رود، اما آنچه باعث برتری یک روش نسبت به بقیه می‌شود دقت اندازه‌گیری است. به دلیل شکل چندگانه فولات، پایداری کم، دشواری استخراج و روش‌های تشخیص پیچیده آن، آنالیز فولات کار آسانی به شمار نمی‌آید. فولات و مشتقات آن به طور طبیعی دارای شکل پلی‌گلوتامات می‌باشند. تعداد زیاد مشتقات فولات و مقادیر عموماً کم آن در مواد غذایی، آنالیز کمّی این ماده را به وظیفه‌ای دشوار مبدل ساخته است. اصول سنجش فولات در مواد غذایی شامل سه مرحله است: ۱- رهایی فولات از بافت سلولی ماده غذایی، ۲- تجزیه شکل پلی‌گلوتامات به شکل مونو و دی‌گلوتامات، و ۳- تشخیص فعالیت زیستی یا غلظت شیمیایی فولات آزاد شده. روش‌های تشخیصی که برای آنالیز فولات به کار می‌روند عبارتند از استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و روش‌های دیگری مانند روش‌های اختصاصی زیستی[۱]. ایتن‌میلر و همکاران در سال ۱۹۹۰ روشی برای استخراج فولات پیشنهاد کردند که در آن علاوه بر استفاده از کانژوگاز، از پروتئاز (EC 3.4.27.31) و آلفاآمیلاز (EC 3.2.1.1) نیز استفاده می‌شد، این روش "استخراج سه آنزیمی" نامیده شد. در این روش انجام استخراج کامل فولاتی که یا در بافت غذایی به دام افتاده و یا درگیر پیوند با پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهاست هدف اصلی محسوب می‌شد، که این هدف توسط استفاده از پروتئاز و آلفاآمیلاز علاوه بر عملیات حرارتی و استفاده از کانژوگاز تحقق یافت. آن‌ها افزایش چشمگیری در میزان فولات به دست آمده از استخراج سه آنزیمی نسبت به استخراج

تک آنزیمی مشاهده کردند. آنزیم پروتئاز برای رهاسازی فولات از بافت پروتئینی نمونه و آنزیم آلفاآمیلاز برای جدا کردن فولات از پلی ساکاریدهای موجود در نمونه مورد استفاده قرار می‌گیرد. فولات‌های استخراج شده توسط دو آنزیم مذکور به شکل پلی-گلوتامات است و از آن‌جا که باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسیس* (مناسب‌ترین باکتری شناخته شده برای این روش) مونوگلوتامات‌ها را خیلی بهتر از پلی‌گلوتامات‌ها تشخیص می-دهد و هم‌چنین اکثر فولات‌های طبیعی به شکل پلی‌گلوتامات می‌باشند استفاده از یک منبع کانژوگاز به منظور تبدیل شکل پلی-گلوتامات به مونوگلوتامات ضروری می‌باشد. پاسخ رشد باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسیس* به مونو، دی و تری‌گلوتامات یکسان است اما در مورد مشتقاتی با زنجیره‌های طولانی‌تر، این باکتری خیلی آهسته‌تر عمل می‌کند. همین طور روش‌های دیگر مثل روش اختصاصی زیستی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا هم قادر به جوابگویی خوبی برای زنجیره‌های طولانی مشتقات فولات نیستند. به همین دلیل برای تبدیل پلی‌گلوتامات به مونو یا دی‌گلوتامات استفاده از آنزیم گلوتامیل کربوکسی پپتیداز (کانژوگاز یا فولات هیدرولاز) انجام می‌شود[۱]. شایان یادآوری است که استخراج سه آنزیمی و روش میکروبی در ایران تاکنون به روش مورد استفاده‌ی غالب برای آنالیز فولیک اسید تبدیل نشده است. این در حالی است که در اغلب کشورها به دلیل دقت بالای این روش برای اندازه‌گیری ویتامین حساسی همچون فولیک اسید استقبال زیادی از آن شده است [۶]. تا به امروز فولات موجود در مواد غذایی مختلفی مانند انواع سبزیجات[۷]، انواع غلات[۸]، حبوبات[۹] و شیر حیوانات مختلف [۱۰]، به روش استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی تعیین شده است. در این پژوهش از دو روش استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای اندازه‌گیری فولات موجود در نمونه‌های آرد استفاده شد، هدف از این کار مقایسه نتایج حاصل از دو روش مذکور و پی بردن به دقت بالای روش سنجش میکروبی بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی

استاندارد: فولیک اسید استاندارد با خلوص ۹۸٪ از شرکت سیگما خریداری شد. توسط بافر فسفات (pH ۷/۲) محلول استاندارد با غلظت (۱۰ ng/ml) ساخته شد[۱۱].

نمونه‌ها: نمونه‌های آرد به صورت تصادفی از نانوایی‌های سطح شهر خریداری شدند و سپس تا روز آزمایش دور از نور و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه داری شدند. نمونه‌های آرد به گونه-ای وزن شدند که حاوی حدوداً ۱ میکروگرم فولیک اسید باشند (۰/۲۵ الی ۱ گرم). بر همین اساس ۰/۹ گرم از آرد شماره یک، ۰/۹ گرم از آرد شماره دو و ۰/۲۵ از آرد شماره دو غنی شده توزین شد. به هر کدام از نمونه‌های استاندارد و آرد ۲۰ میلی لیتر بافر فسفات pH ۷/۲ اضافه و مخلوط شد (اگر نمونه آردی شامل مقادیر کمتری از فولیک اسید بود نباید بیشتر از ۱ گرم را توزین نمود بلکه برای جبران آن باید مقادیر بیشتری از محلول نمونه‌ی موردنظر را در رقیق‌سازی‌های بعدی به کار برد). سپس هر کدام با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شدند. حدود ۰/۱ الی ۱ میلی لیتر ضد کف به آن‌ها اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۳-۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو و پس از آن مجدداً به هر ارلن ۱۰ میلی لیتر بافر اضافه شد[۱۱].

تهیه مایه تلقیح: ۴/۷ گرم محیط کازئی فولیک اسید در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل و تا نقطه جوش حرارت داده شد، سپس در حمام یخ سرد شد و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۲۵ میلی گرم سدیم آسکوربات به آن افزوده شد. پس از آن با ۰/۵ میلی لیتر محلول فولیک اسید استاندارد رقیق شده مخلوط و از فیلتر ۰/۲۲ میکرون جهت سترون سازی عبور داده شد. سپس در شرایط سترون، یک ویال باکتری لیوفیلیزه موردنظر به ۱ میلی لیتر از محلول آماده شده اضافه شد. در این مرحله ۰/۱۵ میلی لیتر از این تعلیق در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع ریخته شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. در این میان ۱۲ میلی لیتر و ۳ میلی لیتر آب مقطر با هم مخلوط و سپس اتوکلاو شد و در حمام یخ خنک شد. کشت باکتریایی گرماگذاری شده در حمام یخ خنک و ۱۰ میلی لیتر از محلول گلیسرول ۸۰٪ خنک شده به آن اضافه شد. محلول حاصل به

آرامی اما به خوبی به هم زده شد. محلول به قسمت‌های ۲ میلی لیتری تقسیم و در ظروف مخصوص و سترون ریخته شد. مایه تلقیح حاصله به مدت ۳ ماه در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس قابلیت نگه‌داری داشت. مایه تلقیح عملیاتی نیز با مخلوط کردن هر یک از محلول های ۲ میلی لیتری تهیه شده با ۴۸ میلی لیتر محلول نمک سترون تهیه شد[۱۱].

آنزیم‌ها: آنزیم پروتئاز و آلفاآمیلاز گرفته شده از *آسپرژیلوس اورزائی* و پلاسمای موش صحرایی از شرکت سیگما خریداری شد. محلول آنزیم های آلفاآمیلاز و پلاسمای موش صحرایی توسط حل شدن آن‌ها در آب یون زدایی شده به دست آمد. فولات طبیعی موجود در آلفاآمیلاز و پلاسمای موش صحرایی توسط مخلوط کردن محلول آنزیم با پودر ذغال به نسبت ۱ به ۱۰ جرمی- حجمی روی یخ به مدت یک ساعت حذف شد[۱۱].

استخراج سه آنزیمی: ۰/۰۱۶ میلی لیتر محلول پروتئاز به هر نمونه اضافه و همگی به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. پس از گرماگذاری، آنزیم پروتئاز توسط ۳ دقیقه اتوکلاو در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس و یا قرار دادن ارلن‌ها در حمام آب جوش غیرفعال شد و سپس تمامی ارلن‌ها خنک شدند. بعد از آن ۱ میلی لیتر محلول آلفاآمیلاز به هر ارلن اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد، در ادامه ۵۰ میکرولیتر محلول کانژوگاز به هر ارلن اضافه و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. پس از آن آنزیم‌ها به مدت ۳ دقیقه و در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس اتوکلاو و غیرفعال شدند و دمای آن‌ها به دمای محیط رسانده شد. pH تمام نمونه‌ها با هیدروکلریک اسید در ۴/۵ تنظیم و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. هر کدام از محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها با عبور از صافی کاغذی، برای مراحل بعدی آماده شدند[۱۱].

استخراج تک آنزیمی: به دلیل اینکه بخش عمده بافت آرد را نشاسته و پلی ساکاریدها تشکیل می‌دهند از این رو در استخراج تک آنزیمی تنها از آنزیم آلفاآمیلاز برای استخراج فولات استفاده شد، اما از آن‌جا که از کانژوگاز برای تجزیه فولات استفاده نشد و همچنین در مواد غذایی غنی شده بخش عمده فولات موجود به شکل فولیک اسید می‌باشد از این رو مقدار فولات اندازه گیری شده در این قسمت به عنوان مقدار فولیک اسید موجود در نمونه در نظر گرفته شد. تهیه محلول‌ها مانند قسمت قبل انجام گرفت و استخراج آنزیمی نیز با حذف مراحل موردنیاز برای پروتئاز و کانژوگاز که در قسمت قبل ذکر شد به همان صورت انجام شد.

سنجش میکروبی نمونه‌های استاندارد: در این قسمت بیست و یک لوله آزمایش ۱۵۰×۲۰ میلی متر مورد استفاده قرار گرفت. شش غلظت مختلف از محلول استاندارد (که هر کدام سه بار تکرار شدند) با افزودن مقادیر ۵ و ۴ و ۳ و ۲ و ۱ و (همراه با ریز اندام) ۰ و (بدون ریزاندام) ۰ میلی لیتر از محلول استاندارد رقیق شده (۰/۳ ng/ml) در هر گروه سه تایی از لوله‌ها ساخته شد. این شش غلظت به ترتیب عبارت بودند از ۰/۱۵ و ۰/۱۲ و ۰/۰۹ و ۰/۰۶ و ۰/۰۳ و ۰ و ۰ نانوگرم در میلی لیتر، که اولین گروه سه تایی دارای غلظت صفر به عنوان شاهد استفاده شد و به آن تلقیحی صورت نگرفت [۱۱].

نمونه‌های آزمایش: دوازده لوله آزمایش با ابعاد مشابه آنچه برای استانداردها به کار رفت، برای هر یک از نمونه‌ها آماده شد. که در هر گروه سه تایی از لوله‌ها به ترتیب ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی لیتر از محلول نمونه‌ی رقیق شده مربوطه ریخته شد.

تمامی لوله‌های استاندارد و نمونه‌ها توسط آب مقطر به حجم نهایی ۵ میلی لیتر رسانده شد. سپس به تمامی لوله‌ها ۵ میلی لیتر فولیک اسید فری دابل استرنت بیسال مدیوم افزوده شد. تمامی لوله‌ها به مدت ۶ دقیقه در دمای ۱۲۳-۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شد. پس از اتوکلاو به منظور به حداقل رساندن واکنش قهوه‌ای شدن که بین آمینواسیدها و قندها در محیط پایه رخ می‌دهد و باعث تیره شدن رنگ و کاهش دسترسی به آمینواسیدهای ضروری می‌شود و همچنین به دلیل جلوگیری از آسیب دیدن مایه تلقیح، تمامی لوله‌ها سریعاً خنک شدند. سپس با رعایت شرایط سترون، به جز گروه سه تایی که به عنوان شاهد استفاده شد به بقیه‌ی لوله‌ها ۵۰ میکرولیتر از مایه تلقیح عملیاتی افزوده شد. سپس تمامی لوله‌ها به مدت ۲۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. پس از گرماگذاری مشاهده شد که در هر لوله به مقدار متناسب با غلظت موجود در لوله، باکتری رشد کرده است. کدورت ناشی از رشد باکتری در هر لوله توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از سل شیشه‌ای خوانده شد[۱۱].

۲-۲- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

آماده سازی نمونه‌های استاندارد فولیک اسید: با افزودن فولیک اسید استاندارد به حجم‌های مختلف بافر فسفات (pH ۷) محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۰/۸- ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد[۱۲].

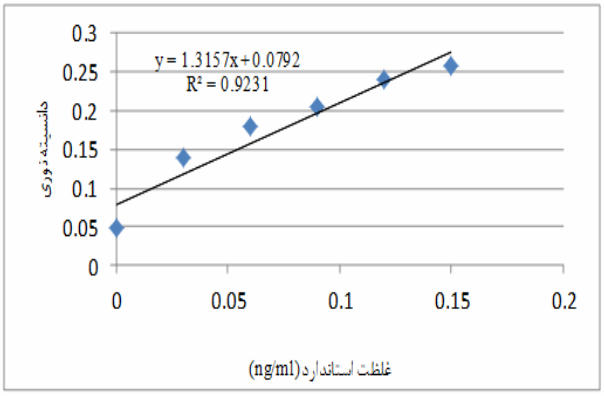
آماده سازی نمونه‌ها: ۵ گرم از هر نمونه آرد با ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات مخلوط شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه در شیکر قرار داده شد. سپس با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. در این مرحله روماند حاصله جمع آوری و پس از عبور از فیلتر ۰/۴۵ میکرون، آماده تزریق به ستون کروماتوگرافی شد [۱۲]. آماده سازی فازهای متحرک: استونیتریل خالص و استیک اسید ۱٪ پس از عبور از صافی ۰/۴۵ میکرون آماده ورود به ستون کروماتوگرافی شدند [۱۲].

برنامه عبور فاز متحرک از ستون: در این آزمایش روش الوشن گرادیانت برای عبور فازهای متحرک از ستون به کار رفت. برنامه گرادیانت با نسبت حجمی- حجمی ۸ درصد استونیتریل و ۹۲ درصد استیک اسید (۱٪) آغاز شد و پس از گذشت ۱۲ دقیقه به ترکیب ۲۶ درصد استونیتریل و ۷۴ درصد استیک اسید (۱٪) رسید. این ترکیب درصد به مدت ۶ دقیقه ثابت ماند و پس از آن طی ۸ دقیقه به ترکیب درصد ۵۰-۵۰ از دو فاز رسید. این ترکیب به مدت ۱۰ دقیقه ثابت و پس از آن در طول ۵ دقیقه مجدداً به ۸ درصد استونیتریل و ۹۲ درصد استیک اسید (۱٪) برگشت، سپس ۹ دقیقه در همین حال باقی ماند [۱۲].

۳- نتایج

۳-۱- استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی

پس از خواندن دانسیته نوری یا همان کدورت ناشی از رشد باکتری در غلظت‌های مختلف استاندارد، همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود منحنی کدورت بر حسب غلظت برای نمونه‌های استاندارد رسم شد.



شکل ۱ منحنی استاندارد حاصل از روش استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی

با توجه به دانسیته‌های نوری خوانده شده برای هر نمونه، غلظت نمونه موردنظر در منحنی استاندارد درون‌یابی شد. طبق نتایج به دست آمده غلظت فولات موجود در آرد شماره یک برابر با ۱/۸۳ و در آرد شماره دو ۱/۸۱ میکروگرم در هر گرم نمونه بود.

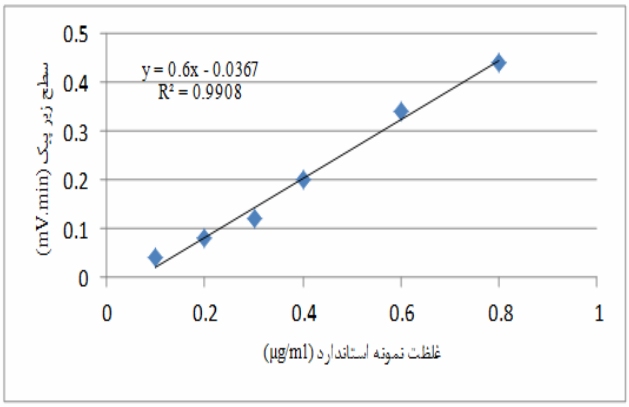
۳-۲- استخراج تک آنزیمی و سنجش میکروبی

مقادیری که در استخراج تک آنزیمی انجام شده توسط آلفاآمیلاز برای فولیک اسید موجود در نمونه ها به دست آمد برای آرد شماره یک ۱/۰۶، برای آرد شماره دو ۰/۸۳ و برای آرد شماره دو غنی شده ۱/۵۸ میکروگرم در هر گرم نمونه بود.

۳-۳- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

با توجه به اینکه امکانات آزمایشگاه برای اندازه‌گیری فولات کل با این روش امکان پذیر نبود لذا تنها مقدار فولیک اسید موجود در نمونه‌ها در این قسمت تعیین شد. زیرا تعیین مقدار فولات با این روش مستلزم استفاده از تمامی مشتقات فولات به عنوان استاندارد بود که امکان آن در اکثر آزمایشگاه‌های کشور وجود ندارد. با توجه به کروماتوگرام‌های حاصل از تزریق نمونه‌های استاندارد به ستون کروماتوگرافی مشخص شد که سطح زیر هر پیک متناسب با غلظت نمونه استاندارد مربوط به آن است. به منظور تعیین غلظت بقیه نمونه‌ها نیاز به رسم منحنی استاندارد است، که این منحنی در شکل ۲ آورده شده است.

مقادیر فولیک اسید اندازه گیری شده برای آرد شماره یک ۰/۸۶، برای آرد شماره دو ۰/۵۹ و برای آرد شماره دو غنی شده ۰/۸۹ میکروگرم در هر گرم نمونه بود.



شکل ۲ منحنی استاندارد حاصل از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

۴- بحث

همان‌طور که در قسمت یافته‌ها ذکر شد با استفاده از روش استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی مقادیر بیشتری فولیک اسید از بافت ماده غذایی استخراج و اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که نتایج حاصل از روش سنجش میکروبی برای آرد شماره یک ٪۲۳، برای آرد شماره دو ٪۴۱ و برای آرد شماره دو غنی شده ٪۷۷ بیشتر از نتایج حاصل از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا است. به طور میانگین می‌توان گفت که مقدار فولیک اسید اندازه‌گیری شده به روش استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی ٪۴۸ بیشتر از مقداری است که توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده در این قسمت با نتایج به دست آمده توسط سایر پژوهشگران که حاکی از بیشتر بودن ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصدی مقادیر فولیک اسید اندازه‌گیری شده به روش استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی نسبت به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بود هماهنگی داشت[۱,۱۳].

در استخراج آنزیمی، آنزیم‌ها پیوند بین فولات و بافت ماده غذایی را می‌شکنند و به این ترتیب فولات آزاد می‌شود، اما در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا روی فولیک اسید تنها یک استخراج شیمیایی توسط بافر صورت می‌گیرد در نتیجه می‌توان گفت که احتمال استخراج ناقص در این روش بیشتر است. یکی دیگر از دلایل راندمان پایین کروماتوگرافی مایع نیز می‌تواند عدم استفاده از ستون‌های استخراج فاز جامد باشد. در مورد مقدار کمتر فولیک اسید موجود در آرد شماره دو نسبت به آرد شماره یک نیز می‌توان گفت که شاید به دلیل مدت زمان طولانی نگه‌داری این آرد، فولیک اسید موجود در آن به ترکیبات دیگر تجزیه شده باشد زیرا این آرد به مدت ۵ ماه پس از تهیه در آزمایشگاه نگه‌داری شد، این در حالی است که آرد شماره یک بلافاصله پس از تهیه مورد آزمایش قرار گرفت. از آنجاییکه فاکتور مدت زمان نگه داری در پایداری فولات و مشتقات آن نقش مهمی ایفا می کند و در پژوهش های بسیاری اهمیت این فاکتور سنجیده شده است[۱۴]، وجود مقادیر کمتر فولات و فولیک اسید در آرد شماره دو نیز میتواند به همین دلیل باشد. روش استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی قادر به اندازه‌گیری فولات کل موجود در نمونه‌ها نیز بود، این در حالی است که به دست آوردن مقادیر فولات کل به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به دلیل عدم دسترسی به تمامی استانداردهای مشتقات فولات میسر نبود. دیگر اینکه اگر امکان دسترسی به تمامی مشتقات فولات به عنوان استاندارد مهیا باشد، به دست آوردن مقدار فولات کل از طریق جمع مقادیر مربوط به هر یک از مشتقات در مقایسه با حالتی که در روش سنجش میکروبی مقدار فولات کل به صورت یکجا خوانده می شود، می تواند از خطای بیشتری برخوردار باشد. با توجه به نتایج به دست آمده و مطالب گفته شده روش استخراج سه آنزیمی و سنجش میکروبی برای اندازه‌گیری میزان ویتامین حساسی همچون فولیک اسید مناسب‌ترین روش اندازه‌گیری به شمار می‌رود. امید است این روش در ایران نیز همچون دیگر کشورها مورد استقبال و استفاده بیشتری قرار گیرد. در جدول (۱) مقایسه‌ای بین این دو روش صورت گرفته و تمامی مزایا و معایب آن‌ها به طور خلاصه آورده شده است.

جدول ۱ مقایسه روش‌های سنجش میکروبی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

اساس روش	مراحل کلیدی	مزایا	معایب
سنجش میکروبی میزان رشد باکتری وابسته به فولات متناسب با مقدار فولات موجود در محیط است. رشد باکتری توسط تغییر کدورت محلول اندازه‌گیری می‌شود.	استخراج فولات از بافت ماده غذایی، دکانژوگاسیون، رشد باکتری، اندازه-گیری کدورت.	هزینه پایین تجهیزات موردنیاز، پاسخ یکسان به اکثر ایزومرهای فولات، توانایی اندازه‌گیری مونو تا پلی گلوتامات‌ها، بسیار حساس، دقت اندازه‌گیری تا کمتر از مقادیر نانوگرم، استاندارد طلایی برای آنالیز فولات.	احتمال تحریک یا بازماندن باکتری از رشد توسط ترکیباتی غیر از فولات، دشوار بودن و زمان‌بر بودن روش، مستلزم داشتن دانش و مهارت میکروبیولوژیکی، نگه‌داری مناسب و حساس باکتری.
کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جداسازی کروماتوگرافیک ایزومرهای فولات بر اساس پاسخ دتکتور به استانداردها.	استخراج فولات، خالص‌سازی فولات استخراج شده، جداسازی کروماتوگرافیک ایزومرهای فولات، تشخیص و کمّی سازی مقادیر فولات باتوجه به پاسخ استانداردها.	اختصاصی بودن روش نسبت به برخی ایزومرهای فولات.	هزینه بالای تجهیزات موردنیاز، نیاز به استاندارد برای تمامی ایزومرهای فولات، حساسیت پایین (تشخیص تا حد میکروگرم)، نامناسب برای دی و پلی گلوتامات‌ها، مقادیر پایین‌تر فولات کل اندازه‌گیری شده نسبت به روش سنجش میکروبی.

۵- منابع

[1] Arcot J., Shrestha A, 2005. Folate: methods of analysis. Food Science and Technology, 16, 253-266.

[2] Raymond T. P., McDonnell A. P., Kelly C. B., 2004. Folic acid: neurochemistry, metabolism and relationship to depression (Review article). Human Psychopharmacology, 19, 477-488.

[3] Malouf R., Grimley E. J., 2009. Folic acid with or without vitamin B12 for the prevention and treatment of healthy elderly and demented people (Review). Wiley publishers, Issue 2.

[4] De-Regil L. M., Fernandez-Gaxiola A. C., Dowswell T., Pena-Rosas J. P., 2010. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects (Review). Wiley publishers, Issue 10.

[5] Tamura T., 1998. Determination of food folate. Nutritional Biochemistry, 9, 285-293.

[6] Puwastien P., Pinprapai N., Judprasong K., Tamura T., 2005. International inter-laboretory analyses of food folate. Food Composition and Analysis, 18, 387-397.

[7] Iwatani Y., Arcot J., Shrestha A. K., 2003. Determination of folate content in some

Australian vegetables. Food Composition and Analysis, 16, 37-48.

[8] Samaniego-Vaesken M. L., Alonso-Aperte E., Varela-Moreiras G., 2010. Analysis and evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish market. Food Composition and Analysis, 23, 419-423.

[9] Hefni M., Ohrvik V., Tabekha M., Witthoft C., 2010. Folate content in foods commonly consumed in Egypt. Food Chemistry, 121, 540-545.

[10] Iyer R., Tomar S. K., Singh R., Sharma R., 2009. Estimation of folate in milk by microbiological assay using tri-enzyme extraction method. Milchwissenschaft, 64, 125-127.

[11] Total folate in cereals and cereal foods: Microbiological assay–Trienzyme Procedure. 2006. *AOAC Official Method 2004.05*. AOAC International.

[12] Alaburda J., Almeida A. P., Shundo L., Ruvieri V., Sabino M., 2008. Determination of folic acid in fortified wheat flours. Food Composition and Analysis, 21, 336-342.

[13] Ruggeri S., Vahteristo L. T., Aguzzi A., Finglas P., Carnovale E., 1999. Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 855, 237-245.

[14] Witthoft C. M., Forsskn K., Johannesson L., Jagerstad M., 1999. Folates - food sources, analyses, retention and bioavailability. Scandinavian Journal of Nutrition, 43, 138-146

Folate Measurement in Fortified Flour by Tri-enzyme Extraction and Microbiological Assay

Mehrabi, S. [1], Shojaosadati, S. A. [2*], Mousavi, Maryam, S. M. [3], Hashemi, M. [4]

1. Masters, Chemical Engineering Faculty, Biotechnology Group, Tarbiat Modares University
2. Corresponding Author, PhD, Professor, Chemical Engineering Faculty, Biotechnology Group, Tarbiat Modares University
3. PhD, Assist. Professor, Chemical Engineering Faculty, Biotechnology Group, Tarbiat Modares University
4. PhD, Assist. Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran.

(Received: 91/10/23 Accepted: 92/4/8)

Nowadays because of several problems and diseases that treat human health, considering special attention to suitable nutrition and achieving confidence about safe and rich content foods is a very important and unavoidable issue. Folic acid is one of required vitamins for our body that must be provided sufficiently. So there are numerous efforts has been done for more reliable measuring of this vitamin in foods. There are several methods available for measuring folic acid. In this research, two methods have been investigated. The main mentioned method was tri-enzyme extraction and microbiological assay which performed by α-amylase, protease, conjugase and a folate dependent microorganism which was *Lactobacillus rhamnosus*. Second method was High performance liquid chromatography that is performed in order to proving reliability and accuracy of the first method. Final results of this research showed that tri-enzyme extraction and microbiological assay has more accurate results comparing to high performance liquid chromatography. The reason is that the amount of folic acid detected by microbiological assay is about 50% more than those detected by High performance liquid chromatography. The main reason for existence of this difference in indicated values is due to complete extraction in microbiological assay. We concluded that tri-enzyme extraction and microbiological assay has more efficiency than High performance liquid chromatography to determine accurate amount of sensitive vitamins such as folic acid. In addition, by this method the amount of total folate can be determined.

Key word: Folic acid, Tri-enzyme extraction, Microbiological assay, Enriched flour, High performance liquid chromatography

* Corresponding Author E-Mail Address: Shoja_sa@modares.ac.ir