

بررسی اثر فرآیند تهیه نان بر محتوای فولات با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و روش میکروبی

آزاده مردانی قهفرخی^۱، محمد سعید یارمند^{۲*}

۱- دانش آموخته دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۰۲)

چکیده

اسید فولیک، یکی از ویتامین‌های ضروری است که کمبود آن در زنان باردار موجب بروز ناهنجاری‌های مادرزادی خصوصاً اختلال لوله عصبی می‌گردد. با توجه به اینکه بدن انسان قادر به ساخت این ویتامین نمی‌باشد به نظر می‌رسد فرایند غنی‌سازی بر روی مواد غذایی پرمصرفی مانند نان، می‌تواند قدم مؤثری در رفع نقایص ناشی از کمبود این ویتامین در افراد باشد. با توجه به اثرات سلامت‌بخش سبوس گندم و وجود اسید فولیک در آن، در این پژوهش اقدام به غنی‌سازی آرد سبوس‌دار (دارای ۷ درصد سبوس گندم) با ۱۰۰ درصد نیاز روزانه به اسید فولیک (۴۰۰ میکروگرم) و سپس بررسی تاثیر فرایند تهیه نان بربری بر پایداری این ویتامین به دو روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و میکروبی گردید. نتایج نشان داد روش میکروبی به دلیل قابلیت اندازه‌گیری فولات طبیعی موجود در نمونه‌ها، مقایر بالاتری را نسبت به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد. همچنین محتوای اسید فولیک و فولات حین فرایند تخمیر نان افزایش یافته و سپس در اثر اعمال فرایند حرارتی پخت نان با کاهش همراه بود. میزان اسید فولیک و فولات باقی‌مانده در محصول نهایی نشان دهنده مقاومت نسبتاً بالای این ویتامین در فرایند تهیه نان بربری و در نتیجه قابلیت غنی‌سازی آرد سبوس‌دار در تأمین اسید فولیک مورد نیاز در افراد بود.

کلید واژگان: اسید فولیک، نان بربری سبوس‌دار، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، روش میکروبی

* مسئول مکاتبات: myarmand@ut.ac.ir

۱- مقدمه

نان یکی از ارزانه‌ترین و ضروری‌ترین غذاهای مصرفی کشور است و به تنهایی قسمت اعظمی از انرژی، پروتئین و سایر مواد مغذی بدن را تأمین می‌نماید. از آنجایی که اغلب در ایران برای تهیه نان از آرد سفید سبوس‌گیری شده استفاده می‌شود، بسیاری از املاح و ویتامین‌های آن طی فرایند آسیاب و تصفیه، (متناسب با درجه استخراج) از دست رفته و نان تهیه شده از نظر دارا بودن این مواد به مراتب فقیرتر از غله اولیه خواهد بود. بنابراین محققین همواره در پی یافتن راه‌هایی برای جبران و یا کاهش این کمبودها بوده‌اند. یکی از راه‌های رفع این کمبودها غنی‌سازی آرد با فیبرها و مواد مغذی از جمله سبوس و ویتامین‌هایی باشد. سبوس گندمیکی از غنی‌ترین منابع غذایی فیبروالیاف گیاهی است که شامل مقادیر بالای پروتئین، کربوهیدرات، املاح معدنی و ویتامین‌های گروه B و E از جمله اسید فولیک بوده و موجب افزایش حرکت دورانی در دستگاه گوارش، پیشگیری از بروز سرطان، بیماری‌های قلبیو کمک به کاهش وزن می‌گردد [۱ و ۲].

ویتامین B₉ یا اسید فولیک که به نام فولاسین و فولات نیز معروف می‌باشد، یکی از ویتامین‌های ضروری از خانواده ویتامین‌های گروه B است که بدن انسان قادر به ساخت آن نبوده و تأمین این ویتامین در بدن وابسته به جذب کافی و مداوم آن از طریق مکمل‌های غذایی روزانه می‌باشد. ساختمان اصلی و پایه فولات از ۲-آمینو-۴-هیدروکسی-۶-متیل پترین^۱ (حلقه پتریدین^۲) تشکیل شده که به وسیله متیلن به پارا آمینو بنزوآتی که با یک یا چند گلوآمیک اسید کتزوگه شده، باند شده است (شکل ۱) [۳].

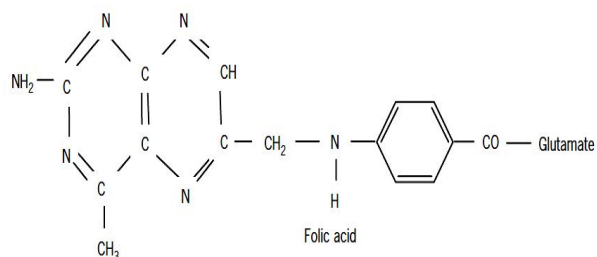


Fig 1 Folic acid structure

از اسید فولیک اغلب در دو فرم سنتزی (PGA^۳) و فرم ذاتی (طبیعی) نامبرده می‌شود. فرم سنتزی اغلب در برنامه‌های غنی‌سازی مواد غذایی با اسید فولیک به کار برده می‌شود و از نظر پایداری در برابر حرارت بسیار مقاومتر از اشکال ذاتی اسید فولیک است [۴].

اسید فولیک نقش‌های مهم و اساسی متعددی در سلامتی دارد که از آن جمله می‌توان به تشکیل گلبول‌های قرمز خون، متابولیسم پروتئین‌ها، تقویت سیستم ایمنی، جلوگیری از ناهنجاری‌های مادرزادی و پیشگیری از برخی سرطان‌ها اشاره کرد [۵-۸]. مصرف اسید فولیک در دوران بارداری در پیشگیری از ناهنجاری‌های مادرزادی امری ضروری است. شایع‌ترین ناهنجاری ناشی از کمبود این ویتامین، بیماری NTD^۴ در نوزادان می‌باشد. در این بیماری، عملکرد اعصاب قسمت تحتانی بدن دچار اشکال شده و فرد دچار علائمی مانند ضعف، فلج پاها و مشکلاتی در روده و مثانه می‌شود و یا کودکان مبتلا دارای جمجمه و مغز ناقص و نافرمان بوده و معمولاً قبل یا کمی بعد از تولد می‌میرند. همچنین مصرف اسید فولیک در دوران بارداری در جلوگیری از از بیماری‌هایی مانند کام شکافته و لب شکری در نوزادان بسیار مؤثر بوده است [۷ و ۹].

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری اسید فولیک پیشنهاد شده که می‌توان از مهم‌ترین آنها روش میکروبی، روش اندازه‌گیری با کروماتوگرافی و روش پیوند با پروتئین^۵ را نام برد. در روش میکروبی از باکتری لاکتوباسیلوس کازنی زیر گونه رامنوسوس^۶ (ATCC 7469) به منظور اندازه‌گیری محتوای فولات استفاده می‌گردد. این میکروارگانیسم قادر به مصرف هر دو شکل اسید فولیک ذاتی و سنتزی موجود در مواد است به‌طوری‌که میکروارگانیسم متناسب با میزان مصرف فولات موجود در محیط رشد کرده و از روی میزان کدورت ایجاد شده در اثر رشد آن و مقایسه آن با نمونه‌های استاندارد، می‌توان میزان فولات موجود در محیط را تعیین کرد [۱۰].

3. Pteroyl glutamic acid

4. Neural tube defects

5. protein-binding assay (RPBA)

6. Lactobacillus casei-rhamnosus

1. 2-amino-4-hydroxy-6- methylpterin

2. pteridine ring

استفاده و آنزیم‌های مورد استفاده در این پژوهش نیز به ترتیب از شرکت مرک آلمان و سیگما آلدراچ خریداری شدند.

۲-۱- غنی‌سازی آرد، تهیه خمیر و نان بربری

ابتدا سبوس گندم که به مدت ۱۰ دقیقه توسط آسیاب قهوه (مدل Feller، آمریکا) آسیاب شده و توسط الک با مش ۲۵ غربال گردیده بود، با نسبت‌وزنی ۷ درصد در نمونه آرد بدون سبوس جایگزین گردید. علت انتخاب این درصد سبوس، پژوهش انجام گرفته پیشین در زمینه اثر جایگزینی درصدهای مختلف سبوس گندم در آرد نان بربری بر خواص نان بربری حاصله می‌باشد. در مطالعه مذکور، بین نان‌های حاوی ۵، ۷، ۱۰ و ۱۲ درصد سبوس گندم، نان بربری حاوی ۷ درصد سبوس بهترین و نزدیکترین خصوصیات رئولوژیکی، رنگی و حسی نسبت به نان شاهد را از خود نشان داد [۱۶].

به منظور غنی‌سازی نان‌ها با اسید فولیک نیز از تیمار ۱۰۰٪ نیاز روزانه به اسید فولیک^۸ استفاده گردید. از آنجایی که میزان توصیه شده اسید فولیک برای مصرف روزانه ۴۰۰ میکروگرم بوده و میانگین وزن هر نان تهیه شده در این تحقیق، ۲۰۰ گرم می‌باشد، برای انجام فرایند غنی‌سازی، مقدار ۴۰۰ میکروگرم اسید فولیک را در شرایط دور از نور خورشید توزین کرده و به ۱۵۰ گرم آرد مورد استفاده برای تهیه هر نان افزوده و کاملاً مخلوط گردید، به این ترتیب در هر گرم آرد مورد استفاده ۲/۶۶ میکروگرم بر گرم اسید فولیک وجود داشت. شایان ذکر است که این مقدار کم اسید فولیک افزوده شده به منظور غنی‌سازی، هیچگونه تاثیری بر خصوصیات رئولوژیکی و حسی نان حاصله نخواهد داشت.

تهیه خمیر بر اساس روش سنتی آن انجام گرفت، به این منظور، به ازای هر ۱۵۰ گرم آرد (شاهد و غنی‌سازی شده با اسید فولیک)، ۳ گرم مخمر خشک، ۲/۳ گرم نمک ۱۸۰ میلی‌لیتر آب (بر اساس نتایج آزمون فارینوگرافی) افزوده گردید و سپس عمل مخلوط کردن همه مواد به صورت یکجا در مخلوط کن اسپیرال آزمایشگاهی (مدل Braun AG Frankfurt، آلمان) با سرعت ۴۰ دور در دقیقه و به مدت ۸ دقیقه انجام گرفت. خمیر حاصله به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و پس از عمل

آلایوردا و همکاران (۲۰۰۸) از دو روش کروماتوگرافی با کارایی بالا با شناساگر فرابنفش^۷ و روش کشت میکروبی برای اندازه‌گیری اسید فولیک سنتزی افزوده شده در آردهای بدون سبوس استفاده کردند. نتایج نشان داد که میزان اسید فولیک اندازه‌گیری شده در روش میکروبی کمی بالاتر از روش کروماتوگرافی با کارایی بالا بوده که علت آن وجود برخی از آنزیم‌ها در این میکروب‌ودر نتیجه توانایی مصرف فولات طبیعی نمونه‌ها بوده است [۱۱].

عمر و همکاران (۲۰۰۹) نیز اثر فرایند تهیه نان را بر روی نوع نان مصری غنی شده با اسید فولیک مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها در این تحقیق از آرد سویا به عنوان منبعی حاوی اسید فولیک طبیعی به جای نوع سنتزی آن استفاده کردند و میزان اسید فولیک را به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری کردند. نتایج آزمایشات نشان داد که در طی پخت میزان اسید فولیک حدود ۲۸ الی ۳۲ درصد کاهش یافت [۱۲].

از آنجایی که غنی‌سازی ماده غذایی پرمصرف و ارزان قیمتی مانند نان، همواره روش موثری در کاهش اثرات نامطلوب ناشی از کمبود این ویتامین بوده است، مطالعات متعددی بر روی محتوای اسید فولیک و تاثیر فرایند تولید نان بر پایداری این ویتامین در نان‌های غنی‌سازی شده صورت گرفته است [۱۱-۱۵].

با توجه به این نکته که خود سبوس گندم نیز حاوی مقادیری اسید فولیک می‌باشد، در این پژوهش اقدام به غنی‌سازی آرد نان بربری سبوس‌دار (۷ درصد) با ۴۰۰ میکروگرم اسید فولیک (۱۰۰ درصد نیاز روزانه افراد) [۸] و بررسی محتوای اسید فولیک نان بربری حاصله طی فرایند تهیه و پخت نان گردید.

۲- مواد و روش‌ها

آرد ستاره (با درجه استخراج ۸۲ درصد) و سبوس گندم از کارخانه آرد آزادگان تهران، مخمر خشک از کارخانه خمیر مایه ناغان و اسید فولیک مورد استفاده جهت فرایند غنی‌سازی و نمونه استاندارد اسید فولیک به ترتیب از شرکت تولید دارو ایران و شرکت سیگما آلدراچ خریداری گردید. محیط‌های کشت مورد

8. Reference daily intake (RDI)

7. high-performance liquid chromatography with fluorescence detection

چانه‌گیری و گذشت ۱۲ دقیقه زمان استراحت چانه‌ها، پخت نان‌ها در فر پخت الکتریکی (مدل Bremen، آلمان) در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. نان‌ها پس از سرد شدن در کیسه‌های پلی اتیلینی بسته‌بندی و در دمای اتاق نگه‌داری شدند [۱۷].

۲-۲- اندازه‌گیری میزان اسید فولیک با استفاده از

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

برای این منظور از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (مدل KNAUER D-14163، آلمان) و شناساگر UV در طول موج ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید. ابتدا محلول‌های استاندارد اسید فولیک در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۱/۷۵ میکروگرم در میلی‌مول بافر پتاسیم فسفات dibasic (pH=8) برای تزریق به دستگاه تهیه گردید. سپس نمونه‌های استاندارد به دستگاه تزریق شد و منحنی استاندارد با توجه به سطح زیر منحنی و غلظت استانداردها رسم گردید [۱۸].

۲-۲-۱- آماده‌سازی و استخراج اسید فولیک از نمونه‌ها

استخراج اسید فولیک از نمونه‌ها توسط روش اوسی و همکارانش (۱۹۹۸) انجام گرفت، بر این اساس ابتدا نمونه‌های خمیر تخمیر یافته و نان توسط دستگاه خشک کن انجمادی (مدل ALPHA 1-2 LDplus، آلمان) خشک گردیدند و پس از خرد شدن توسط آسیاب قهوه، به وسیله الک مش ۴۰ غربال شدند [۱۷]. سپس مقدار ۲ گرم از نمونه مورد نظر را به بشر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر بافر پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۱ مولار (pH 8-7) که حاوی ۰/۰۵ درصد وزنی/حجمی آسکوربات بود منتقل کرده و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت توسط همزن مخلوط گردید. سپس pH مخلوط به وسیله اسید فسفریک به ۶/۹ رسانیده شده و پس از افزودن آنزیم آلفا آمیلاز حاصله از آسپرژیلوس اوریزه^۹ (۱ میلی‌لیتر از محلول ۲۵ میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر آنزیم)، به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از اتمام مرحله هضم آنزیمی، به منظور غیر فعال‌سازی آنزیم دما به ۹۰ درجه سانتی‌گراد رسانیده شد و مخلوط پس از سرد شدن ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید و سپس عصاره بالایی جدا گردید [۱۷].

سپس به منظور استخراج اسید فولیک روی بستر جامد^{۱۰} و انجام فرایند تصفیه^{۱۱} عصاره حاصله، طبق روش واهتریستو و همکارانش (۱۹۹۶) از کارتریج SAX^{۱۲} که از شرکت سیگما خریداری شده بود استفاده گردید. برای این کار، ابتدا آماده‌سازی کارتریج، از طریق مرطوب کردن آن با ۳ میلی‌لیتر هگزان و سپس ۳ میلی‌لیتر متانول و در نهایت با ۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۱ مولار (pH = ۷-۸) که حاوی ۰/۰۵ درصد وزنی/حجمی آسکوربات بود انجام شد و پس از واجد شرایط شدن کارتریج، ۴ میلی‌لیتر از عصاره حاصله از نمونه پس از سانتریفوژ کردن راه، با ۲ میلی‌لیتر محلول بافر رقیق کرده و با سرعت ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه وارد کارتریج کردیم. سپس کارتریج به وسیله ۲ میلی‌لیتر بافر رقیق شده (۰/۰۲ مولار) شستشو شد و در نهایت اسید فولیک به وسیله ۴ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار استات سدیم (pH = ۴/۵) که حاوی ۰/۵٪ وزنی/حجمی دی سدیم فسفات و ۰/۰۵٪ وزنی/حجمی آسکوربیک اسید است، از کارتریج خارج شده و برای تزریق به دستگاه HPLC آماده گردید [۱۸].

۲-۲-۲- کروماتوگرافی

به منظور تزریق به دستگاه HPLC، عصاره قبل از تزریق توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر خالص‌سازی گردید و همزمان به درون ویال‌های مخصوص HPLC مجهز به آشکارساز UV و ستون Nucleosill 100 (5 μm, 125 × 4 mm) C18 منتقل گردید. برای این منظور از فاز متحرک متانول: بافر پتاسیم فسفات (pH 6.8) (K₂HPO₄ 0.0032 و KH₂PO₄ 0.0035 M) به نسبت حجمی ۲۵ به ۷۵ و به صورت غیرگرادیانی^{۱۳}، با سرعت جریان ۱ میلی‌متر در دقیقه در طول موج ۲۸۰ نانومتر استفاده شد [۱۷]. آنالیز کمی اسید فولیک موجود در نمونه‌ها، با مقایسه زمان بازداری و سطح زیر پیک کروماتوگرام‌های مربوط به محلول استاندارد خالص انجام گرفت.

۲-۲-۳- بررسی میزان بازیافت^{۱۴} اسید فولیک در روش

کروماتوگرافی

10. Solid-Phase extraction

11. Clean-up

12. Strong anion-exchange

13. Isocratic

14. Recovery of folates

9. *Aspergillus Oryzae*

برای اندازه‌گیری میزان بازیافت اسید فولیک بر طبق روش گوجسکا (۲۰۰۵) عمل شد. به این منظور ۲۰ میکروگرم اسید فولیک به آرد اضافه گردید و بعد از انجام عملیات استخراج اسید فولیک (مطابق روش شرح داده شده در قسمت قبل)، میزان بازیافت از فرمول (۱) محاسبه گردید [۱۹].

$$R = (C_{\text{found}} - C_{\text{sample}}) / C_{\text{added}} \quad (1)$$

C_{found} = غلظت اسید فولیک اندازه‌گیری شده در نمونه غنی شده

C_{sample} = غلظت اسید فولیک در نمونه، قبل از عمل غنی‌سازی

C_{added} = مقدار اسید فولیک افزوده شده

۳-۲- اندازه‌گیری میزان فولات با استفاده از

روش میکروبی

تحقیقات نشان داده که لاکتوباسیلوس کازئی زیر گونه رامنوسوس (ATCC 7469) مناسبترین میکروارگانیسم در تشخیص میزان اسید فولیک در مواد غذایی به شیوه کشت میکروبی است. این میکروارگانیسم قادر به مصرف هر دو شکل اسید فولیک ذاتی و سنتزی موجود در مواد است. بنابراین با استفاده از آن می‌توان میزان فولات کل موجود در نمونه را تعیین کرد. میکروارگانیسم متناسب با میزان اسید فولیک موجود در محیط رشد کرده و از روی میزان کدورت ایجاد شده در اثر رشد آن و مقایسه با نمونه‌های استاندارد، می‌توان میزان اسید فولیک موجود در محیط را تعیین کرد [۱۹].

۳-۲-۱- آماده سازی نمونه

به منظور استخراج فولات از نمونه‌ها از دو تیمار حرارتی و آنزیمی استفاده شد. ابتدا نمونه‌های نان توسط خشک‌کن انجمادی خشک و سپس توسط آسیاب قهوه کوچک کاملاً خرد گردید. ۱ گرم از نمونه خرد شده به ارلن حاوی ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار ($\text{pH} = 7.4$) حاوی یک درصد اسید آسکوربیک منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط دور از نور و هوا جوشانده شد [۳]. در ادامه به مخلوط حاصل از تیمار حرارتی، ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار ($\text{pH} = 7.4$) و ۱ میلی‌لیتر آنزیم پروتئاز ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده گردید. پس از ۳ ساعت نگاه‌داریدر

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به منظور غیر فعال کردن آنزیم پروتئاز، ظرف حاوی مخلوط ۳ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد و پس از آن تا رسیدن به دمای اتاق سرد گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر آنزیم آلفا آمیلاز ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به آن افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت نگاه‌داری گردید.

pH مخلوط با اسید کلریدریک به ۶ و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. مخلوط نهایی سانتریفوژ و توسط فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتر صاف و تا زمان انجام آزمایش در یخچال و به دور از نور و هوا نگاه‌داری شد [۳].

۳-۲-۲- آماده سازی میکروارگانیسم و تهیه محلول

نیم‌مک‌فارلند

برای فعال کردن لاکتوباسیلوس کازئی از محیط کشت MRS agar استفاده گردید. در زیر هود و در شرایط استریل، میکروارگانیسم روی محیط کشت تهیه شده کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. سپس بر روی محیط کشت حاوی میکروارگانیسم رشد کرده، ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۰۸ درصد ریخته و پس از همزدن، جذب محلول حاصله با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ نانومتر خوانده و تا رسیدن به جذب ۰/۰۸ - ۰/۱۳ با سرم فیزیولوژی رقیق شد [۳].

۳-۲-۳- تهیه محلول‌ها و رسم منحنی استاندارد اسید

فولیک

محلول‌های استاندارد در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۸، ۰/۰۶، ۰/۰۴ و ۰/۰۲ نانوگرم در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار ($\text{pH} = 7.4$) تهیه شد. سپس در هر فالكون ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت فولیک اسید کازئی، ۱ میلی‌لیتر محلول استاندارد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول نیم مک‌فارلند ریخته، کاملاً مخلوط کرده و به مدت ۲۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (از هر نمونه استاندارد ۳ تکرار انجام شد). پس از اتمام مرحله گرم‌خانه‌گذاری، میزان جذب محلول‌های استاندارد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در

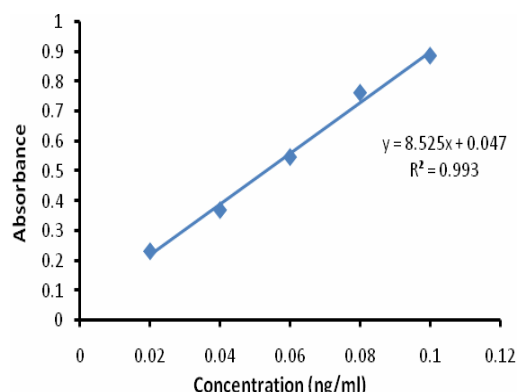


Fig 3 Standard curve of folat by microbiological assay

با مقایسه زمان بازداري و سطح زیر پیک منحنی کروماتوگرام‌های نمونه‌ها با کروماتوگرام استاندارد در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (و با در نظر گرفتن میزان بازیابی محاسبه شده ۹۷٪ در این روش)، و همچنین اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و مقایسه آن با نمودار استاندارد در روش میکروبی، میزان اسید فولیک موجود در نمونه‌ها محاسبه شد (جدول ۱).

همانگونه که در شکل ۸ نشان داده شده است، در تمامی نمونه‌های مورد بررسی، میزان اسید فولیک اندازه‌گیری شده توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با احتساب بازیابی ۹۷٪، کمتر از میزان اندازه‌گیری شده در روش میکروبی بود، تفاوت مشاهده شده را می‌توان به وجود مقادیری فولات طبیعی در خود سبوس و آرد و مخمر نسبت داد. فولات طبیعی در اندازه‌گیری با روش کروماتوگرافی قابل اندازه‌گیری نمی‌باشد در حالی که میکروارگانیزم مورد استفاده در روش میکروبی هر دو شکل فولات طبیعی و سنتزی را مورد مصرف قرار داده و در نتیجه در این روش قادر به اندازه‌گیری فولات کل می‌باشیم [۱۹].

میزان اسید فولیک به کار برده شده به منظور غنی‌سازی در این تحقیق، ۲۶۶ میکروگرم به ازای هر ۱۰۰ گرم آرد مصرفی بوده است. اما همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، این میزان در هر دو روش، کمتر از میزان اولیه افزوده شده اندازه‌گیری شده است. علت این پدیده را می‌توان به از دست رفتن میزان بسیار کمی اسید فولیک حین تهیه و آماده‌سازی نمونه آرد نسبت داد. پس از مرحله تخمیر میزان اسید فولیک و فولات در خمیر حاصله

طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و منحنی استاندارد آنها رسم گردید [۳].

۲-۳-۴- بررسی میزان فولات نمونه‌ها توسط کشت

میکروبی

به فالکون حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت فولیک اسید کازئی، ۱ میلی لیتر از عصاره استخراج و تصفیه شده نمونه و ۱۰۰ میکرولیتر محلول نیم‌مک‌فارلند اضافه کرده و پس از قرار دادن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۲ ساعت، میزان جذب نور آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل Shimadzu، ژاپن) قرائت شد. سپس با قرار دادن میزان جذب قرائت شده در فرمول حاصله از نمودار استاندارد، غلظت اسید فولیک به دست آمد [۳].

۲-۴- طرح آماری

از لحاظ آماری طرح مورد استفاده در این تحقیق در قالب کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن (در سطح معنی‌داری ۵٪) صورت گرفته و آزمایشات در ۳ تکرار انجام شد. به منظور تجزیه و تحلیل نتایج از برنامه آماری SPSS استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

در شکل ۲ و ۳ به ترتیب نمودارهای استاندارد اسید فولیک به دست آمده توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و روش میکروبی نشان داده شده است.

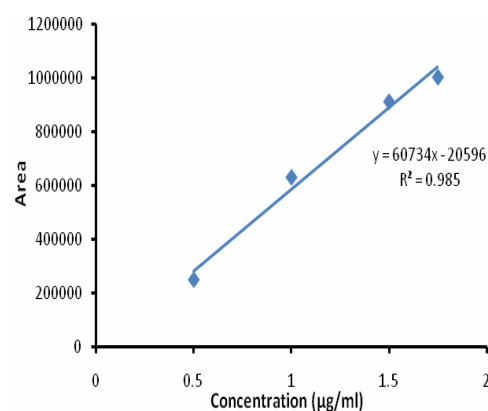


Fig 2 Standard curve of folic acid by HPLC

نسبت به نمونه آرد غنی شده افزایش نشان داد که مطابق با نتایج منتشر شده توسط گوجسکا و همکارانش (۲۰۰۵) علت آن را می‌توان تولید اسید فولیک و فولات به وسیله مخمر طی فرایند

تخمیر عنوان کرد [۱۹]. همچنین نتایج تحقیقات پاترینگ و همکارانش (۲۰۰۵) نشان داد که خود مخمر مورد استفاده در تهیه نان نیز دارای مقدار ۴-۱ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم، اسید فولیک می‌باشد [۲۰].

Table 1 Folic acid and folates determination in samples ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$ dry basis) by the HPLC method (Recovery 97%) and microbiological assay

Samples	Folic acid content (by HPLC method)	Folat content (by Microbiological assay)
Wheat bran	25.6 \pm 0.4 ^{Db}	62.2 \pm 0.7 ^{Da}
Fortified Flour (7% bran+100% RDI Folic acid)	246.2 \pm 4.2 ^{Bb}	262.8 \pm 6.1 ^{Ba}
Fortified Dough (7% bran+100% RDI Folic acid)	271.1 \pm 5.1 ^{Ab}	301.3 \pm 7.3 ^{Aa}
Fortified Bread (7% bran+100% RDI Folic acid)	187.4 \pm 3.6 ^{Cb}	198.9 \pm 5.2 ^{Ca}

Means (\pm standard deviation) within a row with the same lowercase letters are not significantly different at $p < 0.05$, and, means within a column with the same uppercase letters are not significantly different at $p < 0.05$.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج حاصله نشان داد که فرایند غنی‌سازی نان با اسید فولیک می‌تواند روش موثری در تامین نیاز روزانه افراد به این ویتامین ضروری باشد. در طی فرایند تهیه نان، میزان اسید فولیک طی فرایند تخمیر افزایش داشته و سپس در اثر اعمال فرایند حرارتی پخت نان کاهش می‌یابد ولی میزان اسید فولیک باقی‌مانده در نان نهایی، نشان دهنده پایداری حرارتی مناسب این ویتامین و در نتیجه کفایت فرایند غنی‌سازی در نان به منظور تامین نیاز افراد به این ویتامین بود. همچنین استفاده از سبوس در نان‌ها علاوه بر خواص سلامت‌بخشی که دارد موجب افزایش محتوای فولات نان‌ها گردید.

از بین دو روش به کار برده شده در این پژوهش به منظور اندازه‌گیری محتوای اسید فولیکی نمونه‌ها، روش میکروبی به دلیل قابلیت اندازه‌گیری فولات طبیعی موجود در نمونه‌ها مقادیر بالاتری را در مقایسه با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد.

در طی مرحله پخت نان، میزان اسید فولیک و فولات کاهش پیدا کرده است که به دلیل حرارت اعمال شده به خمیر و از دست رفتن اسید فولیک طی فرایند حرارتی پخت نان بوده است [۱۲]، با این وجود نان حاصله با وزن تقریبی ۲۰۰ گرم حاوی مقادیر قابل قبولی فولات بود (۳۹۶ میکروگرم) به طوری که مصرف یک عدد از این نان بربریدر روز توانایی برطرف کردن نیاز روزانه فرد مصرف‌کننده به این ویتامین را دارا می‌باشد.

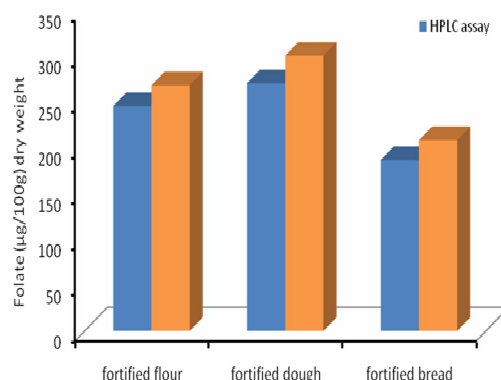


Fig 4 The changing in folate content samples during bread making by HPLC method and microbiological assay.

۵- منابع

- Composition and Analysis, 2008. 21(4): p. 336-342.
- [12] Omar, R.M., Ismail, H.M., Yousef, M.I., Gomma, N.F., Sheta, M., Effect of processing on folic acid fortified Baladi bread and its possible effect on the prevention of colon cancer. *Food Chem Toxicol*, 2009. 47(7): p. 1626-35.
- [13] Heydari, A., Vardast, M.A., Yeganeh Zare, S.H., Determination and comparison of folic acid in fortified wheat flours and breads by high performance liquid chromatography (HPLC) in the Urmia city. *Urmia Medical Journal*, 2016. 27(3): p. 187-197.
- [14] Osseyi, E.S., R.L. Wehling, and J.A. Albrecht, Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. *J Chromatogr A*, 1998. 826(2): p. 235-40.
- [15] Boukid, F., Zannini, E., Carini, E., Vittadini, E., Pulses for bread fortification: A necessity or a choice? *Trends in Food Science & Technology*, 2019. 88: p. 416-428.
- [16] Mardani Ghahfarokhi, A. and M.S. Yarmand, Investigation the effect of bran content on the rheological properties and the quality characteristics of Barbary bread *Food Science and Technology*, 2016. 13(50): p. 11-21.
- [17] Osseyi, E.S., R.L. Wehling, and J.A. Albrecht, Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products | Published as Paper Number 11760, Journal Series, Agricultural Research Division, University of Nebraska, Lincoln, NE 68583-0704, USA.1. *Journal of Chromatography A*, 1998. 826(2): p. 235-240.
- [18] Vahteristo, L., Lehtikoinen, K., Varo, P., Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. *Food Chemistry*, 1997. 59(4): p. 589-597.
- [19] Gujska, E. and K. Majewska, Effect of baking process on added folic acid and endogenous folates stability in wheat and rye breads. *Plant Foods Hum Nutr*, 2005. 60(2): p. 37-42.
- [20] Patring, J.D.M., Jastrebova, J.A., Hjortmo, S.B., Andlid, T.A., Development of a simplified method for the determination of folates in baker's yeast by HPLC with ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. 53(7): p. 2406-2411.
- [1] Sapirstein, H.D., Bioactive compounds in wheat bran, in *encyclopedia of food grains* (Second Edition), C. Wrigley, et al., Editors. 2016, Academic Press: Oxford. p. 268-276.
- [2] Kamal-Eldin, A., Dietary fiber: bran, in *encyclopedia of food and health*, B. caballero, P.M. Finglas, and F. Toldrá, Editors. 2016, Academic Press: Oxford. p. 378-382.
- [3] Devries, J., Rader, J.I., Keagy, P.M., Angyal, G., Microbiological assay-trienzyme procedure for total folates in cereals and cereal foods: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 2005. 88: p. 5-15.
- [4] Scott, J., F. Rébeillé, and J. Fletcher, Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000. 80(7): p. 795-824.
- [5] Hirsch, S., Barrera, G., Leiva, L., Bunout, D., Chapter 44 - Folic Acid and colon cancer: impact of wheat flour fortification with folic acid, in *flour and breads and their fortification in health and disease prevention*, V.R. Preedy, R.R. Watson, and V.B. Patel, Editors. 2011, Academic Press: San Diego. p. 485-494.
- [6] Boushey, C.J., Bresford, S.A., Omenn, G.S., A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *Jama*, 1995. 274(13): p. 1049-57.
- [7] Honein, M.A., Paulozzi, L.J., Mathews, T.J., Erickson, J.D., Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *Jama*, 2001. 285(23): p. 2981-6.
- [8] Fishman, S.M., P. Christian, and K.P. West, The role of vitamins in the prevention and control of anaemia. *Public Health Nutr*, 2000. 3(2): p. 125-50.
- [9] Talaulikar, V. and S. Arulkumaran, Folic acid in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 2013. 23(9): p. 286-288.
- [10] Rader, J.I., C.M. Weaver, and G. Angyal, Use of a microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. *Food Chemistry*, 1998. 62(4): p. 451-465.
- [11] Alaburda, J., et al., Determination of folic acid in fortified wheat flours. *Journal of Food*

Investigation the effect of backing process on folates stability with high-performance liquid chromatography (HPLC) method and microbiological assay

Mardani ghahfarrokhi, A. ¹, Yarmand, M. S. ^{2*}

1. Ph.D. in food science and technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

2. Associate professor, Faculty of science and technology, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran.

(Received: 2019/09/30 Accepted: 2019/12/23)

Folic acid is one of the essential vitamins that deficiency of it causes congenital malformations in pregnant, especially neural tube disorders. Since the human body cannot synthesize this vitamin, enrichment process on bread that is known as one of the most widely consumed foods in the diet of our people, can be one of the most effective steps for eliminating defects caused by vitamin's deficiency in people. Considering the health effects of wheat bran and the presence of folic acid in it, in this study attempt to fortify flour (with 7% wheat bran) by 100% RDI folic acid and then measuring the stability of folic acid in bread making process by HPLC method and microbiological assay. The results indicated that the microbiological assay showed higher amount than the high performance liquid chromatography method because of the ability to measure the natural folate in the samples. Also, during the bread making process, the folic acid and folate content increased during the fermentation process and then decreased by the thermal baking process. The remaining amount of folic acid and folate in the final bread showed the relatively high resistance of this vitamin in the process of Barbari's bread, and thus the ability of the bread fortification process to provide folic acid requirements in adults.

Keywords: Folic acid, Barbari's bran bread, HPLC, Microbiological assay

* Corresponding Author E-Mail Address: myarmand@ut.ac.ir