



بررسی مدل سینتیکی تجزیه فیتیک اسید و افزایش میزان کلسیم و روی در کشت تنها و همزمان

لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

مهران صیادی<sup>۱\*</sup>، الهه عابدی<sup>۲</sup>، شهرزاد مالکی<sup>۳</sup>، کیانا پورمحمدی<sup>۲</sup>

۱- استادیار گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فسا، فسا، ایران.

۳- استادیار گروه مهندسی عمران، دانشکده مهندسی، دانشگاه فسا، فسا، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۹

فیتیک اسید ترکیب ضد تغذیه ای موجود در سبوس و آرد کامل گندم می باشد. به منظور کاهش میزان آن از محیط خمیر توسط کشت تنها و همزمان دو سویه لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با ۴ فرمولاسیون خمیر ترش (فرمول ۱ حاوی مخمر *Saccharomyces cerevisiae*، فرمول ۲ حاوی *Lactobacillus acidophilus* + *Lactobacillus plantarum*، فرمول ۳ حاوی *Saccharomyces cerevisiae*، فرمول ۴ حاوی *Lactobacillus plantarum* + *Saccharomyces cerevisiae* و فرمول ۵ حاوی *Lactobacillus acidophilus* + *Saccharomyces cerevisiae*) استفاده شد و تخمیر در دماهای ۲۷، ۳۲ و ۳۷ °C و زمان های ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت انجام شد. میزان آنزیم فیتاز تولید شده، اسید فیتیک و املاح (کلسیم و روی) در دماهای متفاوت و بازه های زمانی مختلف اندازه گیری شد. مدل سینتیکی درجه یک برای بررسی تجزیه اسید فیتیک و افزایش املاح کلسیم و روی در دماهای مختلف مورد استفاده قرار گرفت. داده ها دارای تطابق مناسبی با این مدل بودند. انرژی فعال سازی مرتبط نیز محاسبه شد. نتایج نشان داد که کشت همزمان *L. plantarum* + *S. cerevisiae* بالاترین محتوای فیتاز تولیدی  $163 \text{ U/mL}$  و بیشترین املاح کلسیم  $27/4 \text{ mg/100g}$  و روی  $1/69 \text{ mg/100g}$  (در دمای ۳۷ °C) بود. اگرچه بیشترین راندمان تولید فیتاز در ۸ ساعت اولیه تخمیر مشاهده شد اما روند رو به افزایش در محتوای عناصر روی و کلسیم تا زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد. روند میزان فیتاز تولیدی به صورت زیر مشاهده شد: *L. plantarum* + *L. acidophilus* + *S. cerevisiae* > *L. plantarum* + *S. cerevisiae* > *L. acidophilus* + *S. cerevisiae* > *S. cerevisiae*. کمترین محتوای فیتیک اسید پس از ۲۴ ساعت تخمیر در دمای ۳۷ °C در خمیر ترش *L. plantarum* + *L. acidophilus* + *S. cerevisiae* مشاهده شد و میزان آن از  $20/5 \pm 563/8 \text{ mg/100 g}$  در آرد کامل به  $43/8 - 110/3 \text{ mg/100 g}$  کاهش پیدا کرد. نتایج نشان داد که کشت همزمان دو باکتری هم و هتروفرمانتیتیو می تواند به صورت مؤثری در افزایش فیتاز تولیدی و کاهش فیتیک اسید مؤثرتر از کشت تک باکتری هم یا هتروفرمانتیتیو باشد.

کلمات کلیدی:

کشت همزمان سویه های لاکتیک اسید باکتری ها، لاکتوباسیلوس پلاتناروم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، سینتیک اسید فیتیک، سینتیک املاح.

DOI: 10.52547/fsct.19.122.1

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.122.30.3

\* مسئول مکاتبات:

M.sayadi@fums.ac.ir

## ۱- مقدمه

اگرچه تحقیقات متعددی در مورد تأثیر تخمیر توسط لاکتیک اسید باکتری‌ها با و بدون مخمر در کاهش فیتیک اسید گزارش شده است اما کشت همزمان دو نوع سویه متفاوت باکتری لاکتیک اسید به همراه مخمر بر راندمان تولید فیتاز، شکستن فیتیک اسید و افزایش حلالیت املاح در زمان‌ها و دماهای مختلف پروف خمیر بررسی نشده است. هدف از این تحقیق مقایسه میزان فیتاز تولید شده توسط کشت جداگانه و همزمان دو باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم و اسیدوفیلوس در محیط خمیر ترش می‌باشد. سپس میزان فیتیک اسید و فلزات  $Ca^{2+}$  و  $Zn^{2+}$  و سینتیک آن‌ها در دماها و زمان‌های مختلف پروف خمیر مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

## ۲- مواد و روش

## ۲-۱- تهیه آغازگر

میکروب‌های PTCC 1058L، *plantarum* PTCC 1643، *acidophilus* PTCC 5052 و *S. cerevisiae* به شکل آمپول‌های خشک شده در خلاء از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شدند. برای تکثیر، مخمر *S. cerevisiae* PTCC 5052 به محیط کشت مایع YGC تلقیح و سپس تحت دمای  $25^{\circ}C$  برای مدت ۷۲ ساعت در داخل دستگاه شیکر انکوباتور (با نام تجاری پارس آزما، ساخت ایران) با سرعت  $130\text{ rpm}$  گرمخانه گذاری گردید. برای تکثیر باکتری *L. plantarum* و *L. acidophilus* از محیط کشت مایع MRS<sup>1</sup> استفاده گردید. سپس محیط کشت تلقیح شده در دمای  $37^{\circ}C$  به مدت ۴۸ ساعت در داخل دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت  $130\text{ rpm}$  گرمخانه گذاری شد. منحنی جمعیت میکروبی و دانسیته جذب (OD) با استفاده از روش پورپلیت و جذب نور (اسپکتروفتومتر مدل Agilent Technologies, Cary 60 در طول موج  $620\text{ nm}$  رسم گردید.

## ۲-۲- تهیه خمیر ترش

برای تهیه خمیر،  $75\text{ g}$  گرم آرد و  $75\text{ g}$  گرم آب با هم مخلوط گردید و سپس خمیر ترش به چهار فرمولاسیون تقسیم شد که شامل فرمول ۱- مخمر  $4\text{ log } S. cerevisiae$ ، فرمول ۲-  $2\text{ log } S. cerevisiae + \text{log } L. acidophilus$ ، فرمول

آرد کامل غلات فراورده‌های غنی از کربوهیدرات، پروتئین و املاح هستند که استفاده زیاد از آن‌ها به دلیل دارا بودن فاکتورهای ضد می‌تواند محدود شود. فیتیک اسید که عمدتاً در بخش سبوس تراکم یافته، مشکلات تغذیه‌ای متفاوتی را باعث می‌شوند که به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود: ۱- اسید فیتیک در سیستم گوارش جانوران با املاح فلزی چند ظرفیتی مانند کلسیم، آهن، روی، مس، منگنز و منیزیم کمپلکس‌های فلزی نامحلول تشکیل داده و از قابلیت جذب آن‌ها می‌کاهد که باعث ایجاد بیماری‌هایی نظیر کم خونی و پوکی استخوان می‌گردد [۱ و ۲] ۲- فیتیک اسید از عملکرد آنزیم آمیلاز و پروتئاز جلوگیری نموده و میزان هضم پروتئین و نشاسته را کاهش می‌دهد [۱ و ۲]، ۳- فیتات قادر است با پروتئین مواد غذایی کمپلکس تشکیل داده و باعث کاهش حلالیت آن‌ها گردد و قابلیت هضم پروتئین در نتیجه اتصال آن با پروتئین ناشی می‌شود [۱ و ۲]، ۴- واکنش سه جانبه بین پروتئین، اسید فیتیک و چربی نیز گزارش شده است [۱ و ۲]. در گندم اسید فیتیک به صورت یکنواخت توزیع نشده است و میزان آن در دانه کامل گندم  $320\text{--}170$  میلی گرم در صد گرم اسید فیتیک می‌باشد و در سبوس و جوانه به ترتیب  $120\text{--}75$  و  $60\text{--}50$  میلی گرم در صد گرم است [۳].

آنزیم فیتاز در غلات، مخمر و لاکتیک اسید باکتری‌ها موجود هستند [۳] و سبب هیدرولیز و جدا شدن قسمت فسفات از فیتیک اسید گشته و آمادگی این ماده را برای جذب مواد معدنی از بین برده و اثرات بد تغذیه‌ای و بافتی را برطرف می‌سازد [۴]. فیتازهای میکروبی به طور فعال توسط بسیاری از قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شوند [۳] و گزارشات متعددی از تأثیر فرایند تخمیر و نقش باکتری‌های اسید لاکتیک و همکاری آن با مخمرها بر کاهش مقدار اسید فیتیک در دسترس است. برخی از نتایج، نقش باکتری‌های اسید لاکتیک در کاهش مقدار فیتیک اسید را به فعالیت فیتازی باکتری و برخی دیگر به ایجاد محیط اسیدی مناسب برای فعالیت فیتازی آنزیم‌های مخمیری مرتبط دانسته‌اند [۵]. بنابراین، تخمیر روش مناسبی برای کاهش اسید فیتیک است. فرایند تخمیر غلات تحت تأثیر عوامل متعددی نظیر ترکیب میکروبی آغازگر، قابلیت تخمیر سوبسترا و نیز شرایط تخمیر (دما، زمان، میزان آب در محیط و pH) قرار دارد [۵].

1. MRS: De Man, Rogosa and Sharpe

از فیلتراسیون (به کمک کاغذ صافی)، فاز زیرین با آب مقطر به حجم ۲۰۰ میلی لیتر رسانیده شد. با افزودن حدود ۰/۷۵ گرم گلایکوکول pH محلول در حد ۲/۵ تنظیم گردید. سپس تا دمای ۸۵°C گرم و پس از ۵ دقیقه بلافاصله به کمک محلول EDTA (0.01 M) تا ظهور رنگ زرد روشن تیترا گردید. مقدار فیتیک اسید به کمک نسبت آهن به فسفر (۴:۶) محاسبه شد. برای بررسی دقت روش اندازه گیری، محلولی با غلظت ۵۰ میلی گرم بر گرم فیتیک اسید (تهیه شده از شرکت سیگما) آماده و طبق روش ذکر شده اندازه گیری گردید. محاسبات نشان داد که دقت اندازه گیری ۹۸/۵٪ می باشد.

## ۲-۵- اندازه گیری فلزات $Ca^{2+}$ و $Zn^{2+}$

۵ گرم از نمونه خمیر در دمای ۵۲۵°C خاکستر شدند و محتوای فلزات برحسب  $\mu\text{g/g}$  توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی (model CE 2502; Cecil, Cambridge, UK) در طول موج ۲۱۳/۸ nm اندازه گیری شد [۸].

## ۲-۶- مدل سازی سینتیک

از مدل واکنش درجه یک برای بررسی تغییرات کلسیم، روی و فیتیک اسید بر حسب زمان استفاده شد [۹، ۱۰ و ۱۱].

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (1)$$

که  $C$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) غلظت ماده،  $t$  (h) زمان، و  $k$  ( $\text{h}^{-1}$ ) ثابت نرخ واکنش می باشد.

با انتگرال گیری از معادله (۱) بین  $t = 0$  و  $t$  خواهیم داشت:

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \quad (2)$$

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (3)$$

که  $C_0$ ، غلظت اولیه ماده، و  $C$  غلظت بعد از زمان  $t$  می باشد. تأثیر دما بر هر واکنش، توسط معادله Arrhenius توصیف می شود که وابستگی ثابت نرخ واکنش ( $k$ ) به دما توسط انرژی فعال سازی ارزیابی می شود [۱۰ و ۱۱]:

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (4)$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

که در آن  $A$  به اصطلاح "ضریب پیشنمایی" گاهی اوقات ضریب فرکانس نامیده می شود،  $E_a$  انرژی فعال سازی، و  $R$  و  $T$  به ترتیب ثابت گازها ( $8.314 \text{ J mole}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) و دمای مطلق (K) می باشند.

۳- حاوی  $2 \log L. plantarum + S. cerevisiae$  فرمول ۴ حاوی  $1 \log L. plantarum + 1 \log L. acidophilus + 2 \log S. cerevisiae$  بودند. خمیرهای ترش در دماهای مختلف ۲۷، ۳۲ و ۳۷°C و زمان های ۱۶، ۸ و ۲۴ ساعت انکوباسیون (دمای پروف خمیر) در آن Memmert ساخت کشور آلمان قرار داده شد. نمونه برداری در زمان های مختلف انجام گردید.

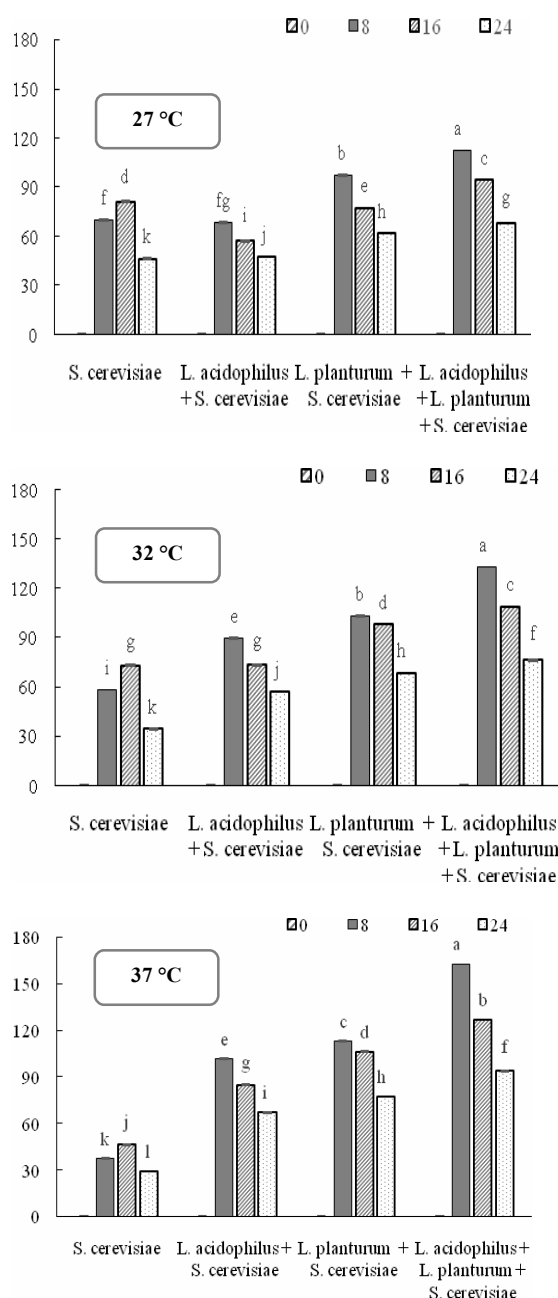
## ۲-۳- اندازه گیری فیتاز

فیتاز در سوپرناتانت خمیر ترش به کمک روش Mohammadi - Kouchesfahani et al. (2019) اندازه گیری شد. نمونه خمیر (۵ گرم) با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر همزنیزه گردید و سپس توسط سانتریفوژ ۵۰۰۰g، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ گردیدند. سپس ۵۰۰  $\mu\text{L}$  از مایع فوقانی با ۲۵۰  $\mu\text{L}$  بافر سدیم استات ۰/۲ M (pH=5.1) و 5 mM فیتات سدیم مخلوط شدند. مخلوط در دمای ۴۰°C به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. واکنش با اضافه کردن ۱ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید (۱/۵٪) خاتمه یافت. سپس ۵۰۰  $\mu\text{L}$  مخلوط واکنش با ۴ میلی لیتر (۲:۱:۱) از استون، آمونیوم مولیبدات ۱۰ mM و سولفوریک اسید ۵N مخلوط گردید. جذب نمونه در طول موج ۳۵۵ nm اندازه گیری شد [۶].

## ۲-۴- اندازه گیری فیتیک اسید

برای محاسبه فیتیک اسید موجود در آرد کامل گندم و خمیر ترش در دما و زمان های مختلف پروف، از روش پاک فطرت و همکاران [۷] با کمی تغییر به شرح ذیل عمل گردید. ابتدا مقدار ۳۰ گرم نمونه تخمیر شده با ۳ برابر حجم آب مقطر شستشو شده و سپس در دستگاه آون مدل Memmert ساخت کشور آلمان در دمای ۷۰°C برای مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. ۲ گرم از نمونه های خمیر خشک شده با ۴۰ میلی لیتر محلول HCl (0.4 M)-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5%) مخلوط و روی دستگاه شیکر به مدت ۱۲۰ دقیقه هم زده شد. سپس ۲۰ میلی لیتر از فاز شفاف رویی مخلوط را برداشته و پس از فیلتراسیون با کاغذ صافی، با ۲۰ میلی لیتر از محلول (5%) FeCl<sub>3</sub> (0.02 M)-HCl (0.4 M)-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> و ۲۰ میلی لیتر سولفوسالیسیلیک اسید (۲۰٪) برای مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش حرارت داده شد. پس از سرد شدن سوسپانسیون، ۲۰ میلی لیتر از محلول شفاف بالایی جدا و پس

## Nuobariene و همکاران (۲۰۱۵)، میزان فعالیت U/mL

۱۴۰ توسط *L. panis* در خمیر مشاهده کرد [۳].

**Fig 1** Phytase (U/mL) content in different sourdough formulations during various time and temperature of proofing.

## ۲-۳- مقایسه میزان فیتیک اسید، املاح کلسیم

## و روی در فرمولاسیون مختلف خمیر ترش

میزان فیتیک اسید اندازه‌گیری شده در آرد کامل گندم در حدود  $563/8 \pm 20/5$  mg/100 g میزان فیتیک اسید در نمونه خمیر کنترل (تخمیر توسط مخمر تنها) در محدوده  $225/4$  -  $279/8$  mg/100 g اندازه‌گیری شد که به میزان

## ۲-۷- طرح آماری

برای انجام آنالیزهای داده‌ها و بررسی اطلاعات بدست آمده از طرح کاملاً تصادفی به کمک نرم افزار SPSS22 استفاده شد. به منظور تعیین اختلاف بین میانگین اعداد (حداقل سه تکرار برای هر از آزمون)، پس از آنالیز واریانس از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح  $p < 0.05$  استفاده گردید.

## ۳- نتایج و بحث

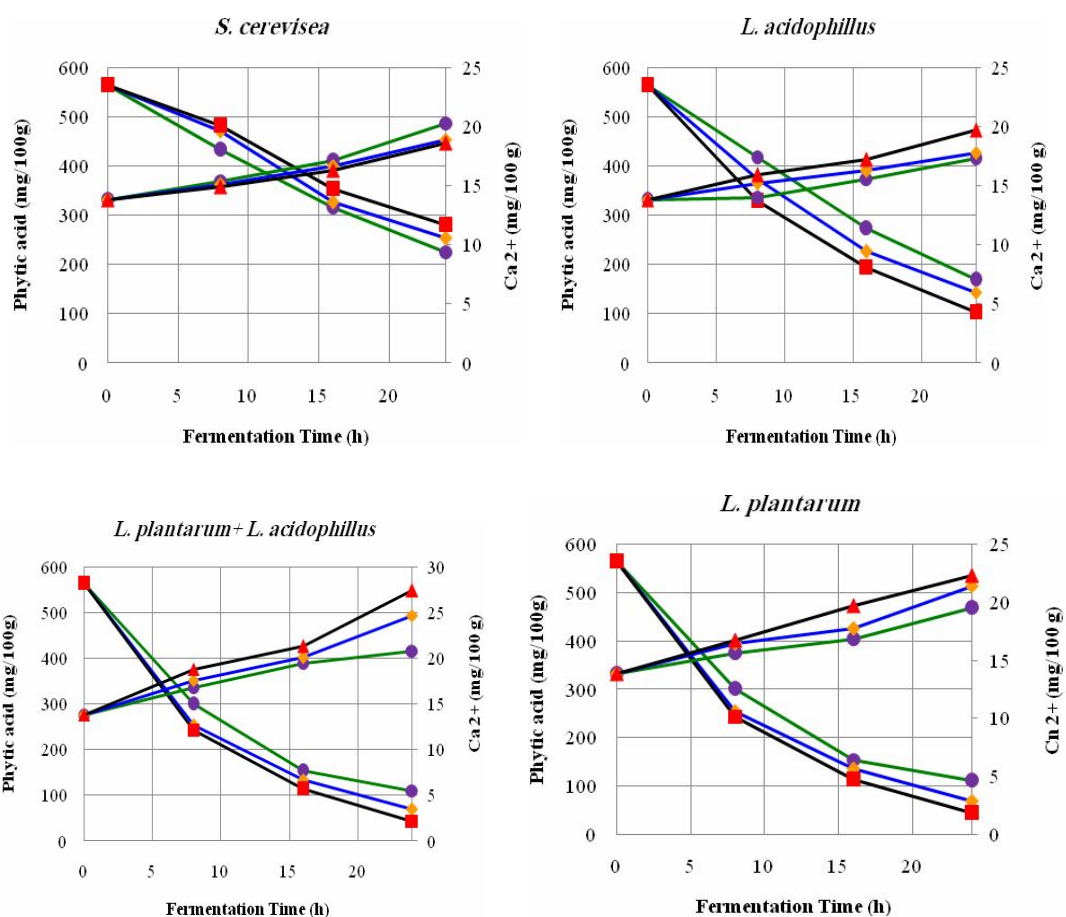
## ۳-۱- مقایسه میزان فیتاز تولید شده در

## فرمولاسیون مختلف خمیر ترش

میزان فیتاز در فرمولاسیون مختلف خمیر ترش وابسته به نوع سویه، دما و زمان تخمیر بود. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بالاترین میزان فیتاز تولیدی در تمامی سویه‌ها در زمان  $8 < 16 < 24$  ساعت تخمیر مشاهده شد. بیشترین میزان فیتاز تولیدی  $2/8 \pm 10/1$  U/mL (*S. cerevisiae* + *L. acidophilus*)،  $3/1 \pm 13/1$  U/mL (*S. cerevisiae* + *L. plantarum*)،  $4/8 \pm 16/3$  U/mL (*S. cerevisiae* + *L. plantarum*) و  $8/8 \pm 16/3$  U/mL (*S. cerevisiae* + *L. acidophilus* + *L. plantarum*) پس از ۸ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  مشاهده شد. با گذشت زمان به ۱۶ و ۲۴ ساعت و کاهش میزان pH و دور شدن از محدوده pH بهینه (۵/۵)، میزان فیتاز نیز کاهش پیدا کرد. میزان فیتاز تولیدی در کشت همزمان *L. plantarum* + *L. acidophilus* به صورت معناداری  $p < 0.05$  بالاتر از کشت *L. acidophilus* و *L. plantarum* به تنهایی، مشاهده شد. بیشترین تولید فیتاز در *L. acidophilus* + *L. plantarum* و *L. acidophilus* + *L. plantarum* مربوط به دمای  $37^\circ\text{C}$  بود درحالی‌که در مورد نمونه کنترل تخمیر یافته توسط مخمر، دمای  $27^\circ\text{C}$  دمای بهینه برای تولید فیتاز  $2/1 \pm 6/3$  U/mL مشاهده گردید. در مطالعاتی که توسط [۱۲] انجام شد، میزان فیتاز تولیدی توسط گونه های مختلف لاکتیک اسید باکتری‌ها *Pediococcus pentosaceus*, *Weissellaviridescens*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus acidilactici*، و *Lactobacillus parabuchneri* در حدود  $1153/0 - 703/1$  U/mL گزارش دادند. همچنین Anastasio et al. (2010) گزارش داد که لاکتوباسیلوس پلانتروم نسبت به دیگر لاکتیک اسید باکتری ها در  $\text{pH } 5/5$  دارای بالاترین میزان فیتاز تولیدی است [۱۳]. در مطالعه دیگری توسط

روند رو به افزایشی در میزان یون‌های روی و کلسیم در نمونه تخمیر مشاهده شد. میزان کلسیم و روی از  $13/8 \text{ mg}/100 \text{ g}$  و  $0/43$  به  $18/6 \text{ mg}/100 \text{ g}$  و  $0/74$  *L. cerevisiae* (  $0/9$  و  $19/7 \text{ mg}/100 \text{ g}$  ) و  $22/3 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ، *(acidophilus + S. cerevisiae)* و  $1/26$  *(L. plantarum + S. cerevisiae)* و  $27/4$  و  $1/69$  *(L. plantarum + S. cerevisiae + L. acidophilus)* در در زمان‌ها و دماهای مختلف پروف خمیر کاهش یافت. با کاهش فیتیک اسید همزمان با افزایش فعالیت فیتاز، میزان‌های  $\text{Ca}^{2+}$  و  $\text{Zn}^{2+}$  (  $34\%$  و  $72\%$  *(S. cerevisiae)* و  $42\%$  و  $109\%$  *(L. acidophilus + S. cerevisiae)*،  $61\%$  و  $193\%$  *(L. plantarum + S. cerevisiae)* و  $98\%$  و  $293\%$  *(L. plantarum + S. cerevisiae + L. acidophilus)* افزایش یافت.

۵۰-۵۹٪ کمتر از میزان فیتیک اسید نمونه آرد گندم بود. کاهش میزان فیتیک اسید در نمونه‌های مختلف به ترتیب (  $\text{mg}/100$  ) *L. acidophilus + S. cerevisiae* (  $102/7 - 169/2 \text{ g}$  ) *L. plantarum + S. cerevisiae* (  $93/4 - 126/7 \text{ mg}/100 \text{ g}$  ) *L. cerevisiae* (  $43/8 - 110/3 \text{ mg}/100 \text{ g}$  ) *(L. plantarum + L. acidophilus + S. cerevisiae)* مشاهده شد. همانطور که مشاهده می‌شود، روند کاهش فیتیک اسید مطابق با میزان فیتاز در نمونه‌های مختلف خمیر می‌باشد. (Karaman et al. و Najafi et al. (2012) گزارش دادند که میزان فیتیک اسید در نمونه خمیر تخمیر شده توسط مخمر (به میزان ۳۰٪) مشاهده شد، در حالیکه کاهش فیتیک اسید نمونه‌های تخمیر شده به وسیله لاکتیک اسید باکتری‌ها (۶۰٪) محاسبه گردید [۱۲ و ۱۴]. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود با کاهش اسید فیتیک،





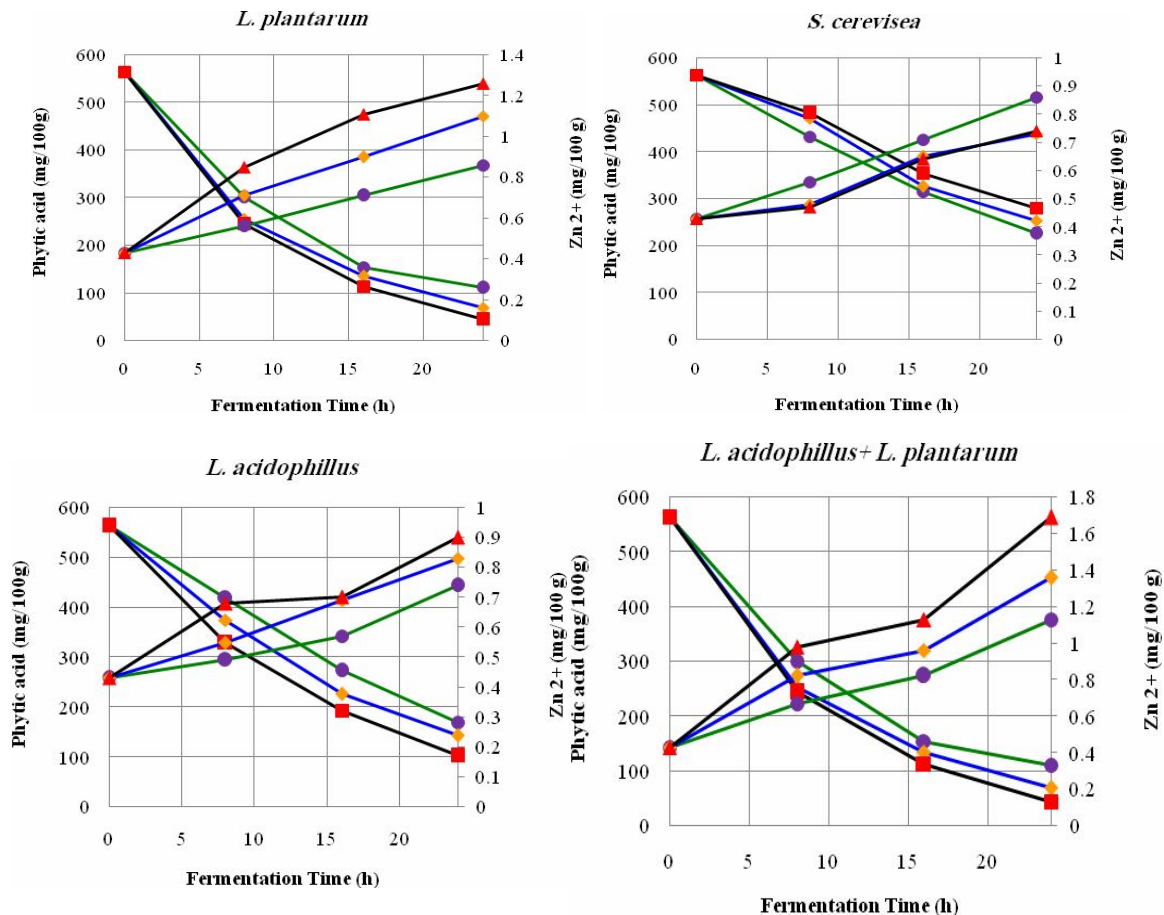


Fig 2 Mineral ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ) content and phytic acid in different sourdough formulations during various time and temperature of proofing. Black line (37 °C), blue line (32 °C) and green line (27 °C).

آزمایشگاهی می‌باشد، بطوریکه در اکثر موارد،  $R^2$  بزرگتر از ۰/۹ می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که ثابت نرخ واکنش برای *S. cerevisiae* با افزایش دما، کاهش یافت، در صورتیکه در ترکیب آن با *L. acidophilus* یا *L. plantarum* و یا *L. acidophilus* + *L. plantarum*، ثابت نرخ واکنش افزایش یافت.

همچنین مقدار  $E_a$  با توجه به معادله Arrhenius برای شرایط مختلف محاسبه شد که در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که انرژی فعال‌سازی برای کلسیم و روی در حالت استفاده از *L. acidophilus* یا *L. plantarum* به همراه مخمر *S. cerevisiae* بزرگتر از انرژی فعال‌سازی برای *S. cerevisiae* به تنهایی می‌باشد. در رابطه با اسید فیتیک، انرژی فعال‌سازی ترکیب *L. plantarum* و *S. cerevisiae* نسبت به *S. cerevisiae* به تنهایی کاهش یافته است ولی ترکیب *L. acidophilus* و *S. cerevisiae* و نیز هر سه مورد با هم باعث افزایش انرژی فعال‌سازی شده است.

نجفی و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند همکاری مناسبی میان لاکتوباسیلوس پلاننتاریم و ساکارومایسس سروویزیه در کاهش مقدار اسید فیتیک خمیر نان وجود دارد که از کاربرد هر کدام به تنهایی بیشتر است، تفاوت در نتیجه به دست آمده می‌تواند به دلیل اختلاف در نوع سویسترا و وجود آنزیم فیتاز گندمدر خمیر باشد. در تحقیق انجام شده توسط Lopez و همکاران (۲۰۰۱) و Karaman و همکاران (۲۰۰۱۸) به این نتیجه رسیدند که حضور لاکتیک اسید باکتری‌ها در محیط خمیر ترش، باعث افزایش موجودیت منیزیم، کلسیم، آهن، روی و فسفر گشت که این افزایش در روند تخمیر خمیر ترش با کاهش فیتیک اسید همراه بود [۴ و ۱۲].

### ۳-۳- نتایج آزمایشگاهی و مدل‌سازی

نتایج آزمایشگاهی تغییرات مقدار کلسیم و روی بر حسب زمان (۰-۲۴ ساعت) برای شرایط مختلف دمایی (۲۷-۳۷ °C) با مدل سینتیکی درجه یک مورد بررسی قرار گرفت که پارامترهای محاسبه شده، در جدول ۱ ارائه شده است. با توجه به جدول، سینتیکی درجه یک دارای تطابق مناسبی با داده‌های

**Table 1** Kinetic parameters of Mineral ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ) content and phytic acid in different sourdough formulations during various time and temperature of proofing

	Temperature (°C)	first order kinetic		Arrhenius equation
		$k$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$R^2$	$E_a$ (J/mole)
<i>S. cerevisiae</i>	Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )	27	0.0151	0.983
		32	0.0126	0.993
		37	0.0117	0.979
	Zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ )	27	0.0299	0.994
		32	0.0225	0.958
		37	0.0224	0.950
	Phytic acid	27	0.0373	0.996
		32	0.0328	0.981
		37	0.0285	0.981
<i>L. acidophilus</i> + <i>S. cerevisiae</i>	Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )	27	0.0084	0.894
		32	0.0107	0.996
		37	0.0147	0.988
	Zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ )	27	0.0207	0.965
		32	0.0283	0.995
		37	0.0326	0.852
	Phytic acid	27	0.0478	0.986
		32	0.0567	0.998
		37	0.0696	0.998
<i>L. plantarum</i> + <i>S. cerevisiae</i>	Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )	27	0.0139	0.985
		32	0.0177	0.977
		37	0.0209	0.989
	Zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ )	27	0.0308	0.987
		32	0.0428	0.927
		37	0.0518	0.835
	Phytic acid	27	0.0644	0.991
		32	0.0722	0.995
		37	0.0792	0.984
<i>L. acidophilus</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>S. cerevisiae</i>	Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )	27	0.0189	0.942
		32	0.0245	0.986
		37	0.0289	0.972
	Zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ )	27	0.0414	0.972
		32	0.0509	0.911
		37	0.0613	0.877
	Phytic acid	27	0.0725	0.978
		32	0.0892	0.997
		37	0.1046	0.998

رشد میکروپ خمیر ترش و تولید فیتاز تأثیر بسزایی داشت و بهترین دما و زمان برای تولید فیتاز دمای  $37^\circ\text{C}$  و زمان ۸ ساعت مشاهده شد. پیشرفت بیشتر در زمان با کاهش اسیدیته و نابوی مخمرها در پی خواهد داشت و راندمان فیتاز کاهش یافت. مدل سینتیک درجه یک برای بررسی روند کاهش اسید فیتیک و افزایش کلسیم و روی بر حسب زمان در دماهای مختلف بکار گرفته شد. نتایج نشان داد که داده ها دارای تطابق مناسبی با مدل بودند ( $R^2 > 0.9$ ). در نمونه‌های شامل *S. cerevisiae* در ترکیب با *L. acidophilus* یا *L. plantarum* یا هر دو، ثابت نرخ واکنش با افزایش دما،

#### ۴- نتیجه گیری کلی

در این مطالعه، خمیر ترش به عنوان منبعی برای فعال سازی فیتاز *S. Cerevisiae* و *L. plantarum* و *L. acidophilus* استفاده شد. در طی این تحقیق فعالیت فیتاز تولیدی *L. acidophilus* + *L. plantarum* + *S. cerevisiae* مشاهده شد. در این میان کشت همزمان دو سویه مختلف لاکتیک اسید باکتری ها، باعث بهبود در روند تولید فیتاز گردید، که به نوبه خود هیدرولیز بیشتر فیتیک اسید و افزایش موجودیت عناصر ضروری را در پی خواهد داشت. زمان و دمای تخمیر بر روند

- bacteria with phytase activity from sourdough. *Food Science and Nutrition*, 7: 3700–3708.
- [7] Pakfetrat, S., Amiri, S., Radi, M., Abedi, E., Torri, L. (2019). Reduction of phytic acid, aflatoxins and other mycotoxins in wheat during germination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 4695–4701.
- [8] Vafaei, M., Naseri, M., Abedi, E., Babaei, S.S., Imani, A., Torri, L. (2020). Principal component analysis of time-related changes of some essential mineral contents of canned silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in different filling media. *Biological Trace Element Research*. 193.
- [9] Van Boekel, M. (1996). Statistical aspects of kinetic modeling for food science problems. *Journal of Food Science*, 61: 477–486.
- [10] Van Boekel, M.A.J.S. (2008). Kinetic modeling of food quality: a critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7: 144–158.
- [11] Van Boekel, M. (2021). Kinetics of heat-induced changes in foods: A workflow proposal. *Journal of Food Engineering*, 306: 110634.
- [12] Karaman, K., Sagdic, O., Durak, M.Z. (2018). Use of phytase active yeasts and lactic acid bacteria isolated from sourdough in the production of whole wheat bread. *LWT Food Science and Technology*, 91: 557–567.
- [13] Anastasio, M., Pepe, O., Cirillo, T., Palomba, S., Blaiotta, G., Villani, F. (2010). Selection and use of phytate - degrading LAB to improve cereal - based products by mineral solubilization during dough fermentation. *Journal of Food Science*, 75: M28–M35.
- [14] Najafi, M.A., Rezaei, K., Safari, M., Razavi, S.H. (2012). Use of sourdough to reduce phytic acid and improve zinc bioavailability of a traditional flat bread (sangak) from Iran. *Food Science and Biotechnology*, 21: 51–57.
- افزایش یافت در حالیکه در نمونه *S. cerevisiae* به تنهایی، کاهش ثابت نرخ واکنش با افزایش دما مشاهده شد. همچنین انرژی فعالسازی محاسبه شده برای کلسیم و روی در ترکیب *S. cerevisiae* با دوسویه *L. acidophilus* یا *L. plantarum* افزایش می یابد. در صورتیکه برای اسید فیتیک در نمونه ترکیب *S. cerevisiae* و *L. plantarum*، کاهش در انرژی فعالسازی نسبت به نمونه اولیه مشاهده شد. هرچند در دو حالت دیگر، انرژی فعالسازی افزایش یافت.

## ۵- منابع

- [1] Handa, V., Sharma, D., Kaur, A., Arya S.K. (2020). Biotechnological applications of microbial phytase and phytic acid in food and feed industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25: 101600.
- [2] Khan, A., Ghosh, K. (2013). Phytic acid - induced inhibition of digestive protease and  $\alpha$  - amylase in three Indian major carps: An in vitro study. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44: 853–859.
- [3] Nuobariene, L., Cizeikiene, D., Gradzeviciute, E., Hansen, Å.S., Rasmussen, S.K., Juodeikiene, G., Vogensen, F.K. (2015). Phytase-active lactic acid bacteria from sourdoughs: Isolation and identification, *LWT-Food Science and Technology*, 63: 766–772.
- [4] Lopez, H.W., Krespine, V., Guy, C., Messenger, A., Demigne, C., Remesy, C. (2001). Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 2657–2662.
- [5] Shirai, K., Revah-Moiseev, S., García-Garibay, M., Marshall, V.M. (1994). Ability of some strains of lactic acid bacteria to degrade phytic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 19: 366–369.
- [6] Mohammadi - Kouchesfahani, M., Hamidi - Esfahani, Z., Azizi, M.H. (2019). Isolation and identification of lactic acid





## Investigation of kinetic model of phytic acid degradation and increase of calcium and zinc in single and co- culture of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*

Sayadi, M. <sup>1\*</sup>, Abedi, E. <sup>2</sup>, Maleki, Sh. <sup>3</sup>, Pourmohammadi, K. <sup>2</sup>

1. Assistant Professor of Food Safety and Hygiene, Faculty of Health, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran.
2. Associate Professor of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa University, Fasa, Iran.
3. Assistant Professor of Civil Engineering, Faculty of Engineering, Fasa University, Fasa, Iran.

### ABSTRACT

Phytic acid is an anti-nutritional compound found in bran and whole wheat flour. In order to reduce the amount of dough medium, single and co- culture of two strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* with 4 sourdough formulations (Formula 1 containing *S. cerevisiae* yeast, Formula 2 containing *L. acidophilus* + *S. cerevisiae*, Formula 3 containing *L. plantarum* + *S. cerevisiae* and Formula 4 containing *L. plantarum* + *L. acidophilus* + *S. cerevisiae*) were used and fermentation was performed at 27, 32 and 37 ° C at 8, 16 and 24 h. A first-class kinetic model was used to investigate the decomposition of phytic acid and the increase of calcium and zinc salts at different temperatures. The data were in good agreement with this model. The associated activation energy was also calculated. The amount of phytase, phytic acid and minerals (calcium and zinc) were measured at different temperatures and time intervals. First order model reaction was used to investigate the degradation of acid phytic and the increase of calcium and zinc at different temperatures. The data were in good agreement with this model. Moreover, the corresponding activation energies were calculated. The results showed that co- culture of *L. plantarum* + *L. acidophilus* + *S. cerevisiae* represented the highest content of phytase 163 U/mL and the highest calcium 27.4 mg/100g and zinc 1.69 mg/100g (at 37 °C). Although the highest efficiency of phytase production was observed in the first 8 hours of fermentation, however an increasing trend was observed in the content of zinc and calcium up to 24 hours of fermentation. The trend of phytase production was observed as follows: *L. plantarum* + *L. acidophilus* + *S. cerevisiae* > *L. plantarum* + *S. cerevisiae* > *L. acidophilus* + *S. cerevisiae* > *S. cerevisiae*. Moreover, the lowest content of phytic acid was observed after 24 hours of fermentation at 37 °C in sourdough of *L. plantarum* + *L. acidophilus* + *S. cerevisiae* and its amount reduced from 563.8 ± 20.5 mg/100 g in wholemeal flour to 43.8-110.3 mg/100 g. The results showed that co-culture fermentation was effective method to increase phytase which in turn decrease phytic acid.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2021/ 12/ 01  
Accepted 2022/ 01/ 09

#### Keywords:

Co-culture lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, Phytic acid kinetic, Mineral kinetic

DOI: 10.52547/fsct.19.122.1

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.122.30.3

\*Corresponding Author E-Mail:  
M.sayadi@fums.ac.ir