مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

غربالگری جدایه های باکتری های اسید لاکتیک از فرآورده‌های لبنی سنتی خراسان به منظور ارزیابی تولید فولات خارج سلولی

فاطمه حسینی[۱] ، محمدباقر حبیبی نجفی[۲*]، محمدرضا عدالتیان دوم[۳]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه فردوسی مشهد ، مشهد، ایران.

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه فردوسی مشهد ، مشهد، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه فردوسی مشهد ، مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱ /۰۳/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۰

کلمات کلیدی:

کواتروفولات،

سنجش میکروبی،

استرپتوکوکوس ترموفیلوس،

لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس،

لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه لاکتیس،

لاکتوباسیلوس هلوتیکوس.

DOI: 10.22034/FSCT.19.130.37

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.4.3

* مسئول مکاتبات:

habibi@um.ac.ir

چکیده

فولات واژه ای است که برای مجموع ترکیبات دارای فعالیت زیستی مشابه به کار می‌رود. فولات (پلی گلوتامات ها)، تمام اشکال ویتامین های این خانواده را به طور طبیعی شامل می شود. به عبارت دیگر اسید فولیک شکلی از فولات است که به فرم اکسیده می‌باشد، این ترکیب پایدار بوده و به راحتی توسط انسان قابل جذب می‌باشد (مونوگلوتامات) [۱]. در این مطالعه میزان تولید فولات خارج سلولی(کواتروفولات) بررسی شد بنابراین از روش سنجش میکروبی به عنوان روش اصلی استفاده شد.این روش متکی بر رشد باکتریایی و سنجش کدورت (ATCC 7469) است که به عنوان ارگانیسم سنجش استفاده شد[۲و ۳]. در این پژوهش ۴۷ سویه باکتری ایزوله شده از فرآورده های لبنی سنتی به ویژه ماست محلی مناطق عشایر خراسان مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از این ارزیابی نشان داد که دو سویه شماره(۲۵و۲۶) از سویه‌های *لاکتوباسیوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس* تولید قابل توجهی از غلظت بالای فولات (۱۰۲,۳۴ µg/mL و۱۳۳,۲۳µg/mL) را داشتند، همچنین سویه K73 از سویه‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، سویه شماره ۷۳ از سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه لاکتیس* و سویه شماره ۸۷ از سویه‌های *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به ترتیب (۹۰,۲۹ µg/mL ، ۳۹,۷۱µg/mL ، ۱۷,۹۴ µg/mL) نیز تولید مقادیر بالایی از غلظت کواتروفولات را داشتند. با توجه به این پژوهش مشخص شد جدایه‌های مورد بررسی توانایی بالقوه‌ای در تولید فولات خارج سلولی دارند. همچنین روش سنجش میکروبی بعنوان روشی کارآمد از قابلیت لازم برای اندازه گیری فولات و مشتقات آن برخوردار است.

۱- مقدمه

فولات یک ریز مغذی ضروری است که در متابولیسم همه موجودات زنده شرکت می کند. این ویتامین متعلق به ویتامین های گروه B محلول در آب است که شامل تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین، پیریدوکسین، اسید پانتوتنیک، بیوتین و کوبالامین نیز می شود. فولات، به عنوان یک ویتامین محلول در آب، برای رونویسی موثرDNA، ترمیمDNA و فرآیند متیلاسیون مورد نیاز می‌باشد[٤و ٥]. همچنین این مشتقات از عوامل موثر در متابولیسم سلولی و سنتز نوکلئوتیدها، ویتامین ها و بعضی اسیدهای آمینه می باشند. DNA در سلول های انسانی می تواند به صورت جدی تحت حمله رادیکال های آزاد قرارگیرد، بنابراین حضور و فعالیت ترکیبات با خاصیت آنتی اکسیدانی به منظور سلامتی سلول از نیازهای اساسی می باشد. فولات با داشتن خواص آنتی اکسیدانی ژنوم انسانی را از حمله رادیکال های آزاد در امان نگه داشته و در نتیجه نقش مهمی در ترمیم DNA و به دنبال آن، مکانیسم های رونویسی به عهده دارد [٦]. متیلاسیون DNA به نوبه خود یک عامل مهم اپی ژنتیک در بیان ژن ، پایداری DNA ، یکپارچگی DNA و جهش زایی است [٧]. اسید فولیک یک شکل سنتزی از فولات می باشد که به طور معمول به عنوان غنی کننده مواد غذایی و مکمل های تغذیه به کار گرفته می شود. اسید فولیک توسط یک حلقه پتریدین متصل به پارا آمینو بنزوئیک اسید (p-ABA)[1] و L- گلوتامیک اسید، دو پیش ساز سنتز فولات ها ساخته می شود . تتراهیدروفولات (THF) [2] و مشتقات آن (به طور کلی بعنوان فولاتهای فرعی گروه بندی می شوند) سازنده های حیاتی آنزیم های متابولیکی هستند که در واکنش های انتقال کربنی مشارکت دارند [8].

فولات طبیعی شامل ٥- متیل تترا هیدرو فولات(5-MTHF)[3]، ٥- فرمیل تترا هیدرو فولات(5-formyl-THF)[4]، ١٠- فرمیل تترا هیدرو فولات(10-formyl-THF)[5]، ١٠,٥- متیلن تترا هیدرو فولات(5,10-methylene-THF)[6]، ٥- فرمینوتتراهیدرو فولات(5 -formimino-THF)[7]، ٨,٧,٦,٥- تترا هیدرو فولات و دی هیدروفولات(DHF)[8] است. در طبیعت، فولات ها به صورت پلی گلوتامات با زنجیره گاما پلی گلوتامیل مرتبط با گلوتامات THF یافت می شوند [٩].

پترووویل پلی گلوتامات‌ها با حداکثر باقی مانده اسید گلوتامیک نیز می تواند در طبیعت وجود داشته باشد. فولات‌های پلی گلوتامیل سوبستراهای مورد علاقه برای اکثر آنزیم های وابسته به فولات هستند[١٠و ١١]. از سوی دیگر، فولات قابل انتقال در حیوانات، عموماً اشکال مونوگلوتامیل فولات را ترجیح می‌دهند [١٠]. فولات‌های اصلی درون سلولی پتروئیل پنتاگلوتامات‌ها هستند، در حالی که پتروئیل مونوگلوتامات‌ها در خارج از سلول عمومیت بیشتری دارند. اشکال مختلف فولات در درجات مختلف تا حدودی ناپایدار هستند، که عمدتاً به دلیل تجزیه اکسیداتیو ساختاری، ناشی از نور می‌باشد [١٠].

رشد و تبدیل سلولی در بسیاری از بافت ها مثل ؛ لوکوسیت ها، اریتروسیت ها و موکوس روده کوچک نیاز مبرمی به فولات دارد. کمینه نیاز به فولات برای افراد بالغ (که شامل زنان باردار و شیرده نمی گردد)، در حدود ٥٠ میکروگرم در روز می باشد[٩]. با این حال مصرف یک رژیم غذایی حاوی تقریبا، ٢٠٠ میکروگرم در روز توصیه شده است [١٢]، این مقدار مصرف برای زنان باردار در حدود ٤٠٠ میکروگرم در روز توصیه شده است[١٣].

1. Para-amino benzoic acid
2. Tetrahydrofolate
3. 5-methyltetrahydrofolate
4. 5-formyltetrahydrofolate
5. 10-formyltetrahydrofolate
6. 5,10-methylentetrahydrofolate
7. 5-formiminotetrahydrofolate
8. Dhydrofolate

فولات ترکیب حساسی نسبت به حرارت می باشد، به طوریکه استفاده از فرآیندهای حرارتی مانند پاستوریزاسیون و فرادما (UHT) [9] در شیرخام؛ باعث کاهش شدید سطح این ویتامین خواهد شد. این حساسیت فولات نسبت به فرآیندهای مختلف، اهمیت استفاده از باکتری های اسید لاکتیک تولید کننده فولات را دوچندان کرده است[۱۴]. شیرهای تخمیر شده به واسطه فعالیت باکتری‌های اسید لاکتیک حاوی مقادیری بالاتر از دو تا چهار برابر از مشتقات فولات در مقایسه با شیر خام می‌باشند[۱۵].

هدف نهایی از انجام این پژوهش غربالگری باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از فراورده های لبنی سنتی خراسان از نظر تولید فولات خارج سلولی و استفاده از روش سنجش میکروبی در اندازه‌گیری تمامی اشکال فولات به ویژه کواتروفولات می‌باشد. به همین منظور جهت شناسایی جدایه های تولید کننده فولات خارج سلولی (۵- متیل تترا هیدروفولات) یا همان کواتروفولات (**Qfolate**) [10] از روش سنجش میکروبی (MA) [11] استفاده شد. همچنین با استفاده از منحنی استاندارد و دستیابی به یک معادله خطی بر مبنای کواتروفولات تولید فولات خارج سلولی بصورت کمی بر مبنای µg/ml نیز محاسبه شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- روش غربالگری جدایه ها

در این پژوهش به طور مجموع از۴۳ سویه از باکتری‌های اسید لاکتیک ایزوله شده از فرآورده‌های سنتی خراسان (ماست مناطق عشایری خراسان، کره مسکه و کشک محلی)، که ویژگی‌های تکنولوژیکی آنها قبلا مورد بررسی قرار گرفته بود (12 سویه *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، ۱۵ سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس*، ۱۳ سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه لاکتیس*، ۳ سویه *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*)، به منظور غربالگری از نظر تولید فولات خارج سلولی استفاده شد [16,17,18]. برای بررسی میزان تولید فولات و غربالگری سویه های مذکور از محیط کشت FACM [12] عاری از فولات و باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (ATCC 7469)، به عنوان باکتری شاخص مصرف کننده فولات، استفاده شد. از آنجا که میزان رشد باکتری شاخص وابسته به فولات و متناسب با فولات موجود در محیط است؛ رشد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در محیط کشت باکتری های اسید لاکتیک پس از جداسازی باکتری به معنی تولید فولات خارج سلولی توسط باکتری اسیدلاکتیک در محیط کشت می باشد[۱۹].

۲-۲- میکروارگانیسم‌ها و محیط کشت

در مجموع سویه های مورد بررسی در این پژوهش ۴۳ سویه ایزوله شده از فرآورده های لبنی خراسان است (جدول ۱).

به همین منظور سویه‌های(*استرپتوکوکوس ترموفیلوس*) در محیط کشت M17 و سویه‌های *لاکتوباسیلوس*(*لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، *لاکتوباسیلوس لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*) در محیط کشت MRS [13] به مدت ۲۴ – ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. محیط کشت استاندارد جهت رشد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (MTCC 1408 ، ATCC7469/DSM20021)، محیط فولیک اسید کازئی(Difco) است، که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

9. Ultra High Temperature
10. Quatrofolate
11. Microbial Assay
12. Folic Acid Casei Medium
13. Man-Rogosa-Sharpe

Table 1 Strains Selected for Screening of Qfolate Producing

Strains (*L.Bulgaricus*)	Source (Yogurt & Milk)	Strains (*S.thermophilus*)	Source (Yogurt&Butter& Kashk)	Strains (*L.Lactis*)	Source (Yogurt)	Strains (*L.helveticus*)	Source (Yogurt)
55	Nohoor	Y106	Maskeh	63	Toomaq	82	Hamzeh
52	Nohoor	Y109	Maskeh	73-1	Toomaq	86	Hamzeh
26	Nohoor	Y19	Maskeh	69	Toomaq	87	Hamzeh
56	Nohoor	Y75	Maskeh	73	Toomaq		
22	Nohoor	B170	Maskeh	66	Toomaq		
85	Nohoor	K72	kashk	65	Toomaq		
29	Nohoor	K73	kashk	68	Toomaq		
16	Nohoor	K55	kashk	71	Toomaq		
25	Nohoor	K47	kashk	62	Toomaq		
27	Nohoor	R34	kashk	64	Toomaq		
18	Nohoor	R57	kashk	67	Toomaq		
50	Nohoor	79	Hamzeh-kanloo	73-2	Toomaq		
54	Nohoor			75	Toomaq		
23	Nohoor						
49	Nohoor						

۲-۳- اندازه گیری فولات خارج سلولی با باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (ATCC 7469)

سویه باکتری اسید لاکتیک مذکور، که در ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره شده بود، در MRS مایع تازه تلقیح شده و ۲٤ ساعت قبل از استفاده؛ در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. پس از رشد، ۱ میلی لیتر از محیط کشت مایع، سانتریفوژ شده و رسوب حاصل ۳ بار با محلول نمکی شستشو داده می شود. رسوب حاصل در حجم اصلی دوباره به حالت تعلیق درآمده و از آن برای تلقیح در FACM ، تازه به میزان ۲٪ (V / V) استفاده شد. شرایط گرمخانه گذاری، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۲٤ ساعت بود. سپس با استفاده از میکروتیتر پلیت ۹٦ خانه‌ای به هر چاهک میزان ٤٪ (V / V) از کشت اولیه FACMدر ۱۰ میلی لیتر از محلول دو برابر شده FACM که حاوی ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر کلرامفنیکل است، افزوده شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت باکتری‌های رشدیافته *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به هر چاهک اضافه و مخلوط شد. بعد از دوره گرمخانه گذاری (٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) کدورت سلولی نمونه ها، در OD_{580} نانومتر خوانده شد[۲۰].

۲-٤- نحوه رسم منحنی استاندارد جهت محاسبه کمی میزان فولات خارج سلولی

رقت‌های مختلف با استفاده از کواتروفولات(۵- متیل تترا هیدرو فولات)، تهیه شد که براساس این رقت‌ها غلظت‌های مختلفی از کواتروفولات براساس رشد باکتری مصرف کننده فولات یعنی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*(ATCC7469) در این رقت‌ها بر مبنای روش میکروارگانیسم سنجی(جدول۲)، بدست آمد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- رسم منحنی استاندارد و اندازه گیری کمی فولات خارج سلولی

پس از خواندن دانسیته نوری یا همان کدورت ناشی از رشد باکتری در غلظت‌های مختلف استاندارد (جدول ۲)، همانطور که در (شکل ۱) مشاهده می‌شود، نقاط جذب کدورت برحسب µg/ml برای نمونه‌های استاندارد رسم شد. با برازش معادلات مختلف، معادله خطی درجه اول از بالاترین برازش (R2) برخوردار بود که از آن جهت محاسبه مقادیر کمی تولید فولات خارج سلولی در مطالعه استفاده شد.

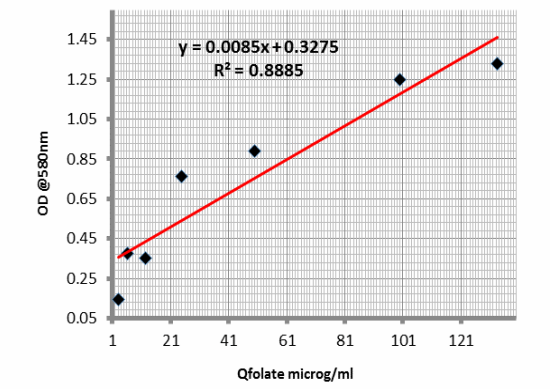

Fig 1 Standard curve of quantitation amounts of Qfolate and the best equation fitted (linear equation) for Calculating quantitation amounts of extracellular folate.

Table 2 Growth of *Lactobacillus rhamnosus* in culture medium containing extracellular folate.

5-Methyltetrahydro-folate(Qfolate) (µg/mL)	Optical density of Lactobacillus rhamnosus growth OD@560 nm (µg/mL)
3.12	0.14 ±0.004
6.25	0.37 ±0.01
12.5	0.35 ±0.008
25	0.76 ±0.003
50	0.89 ±0.01
100	1.25 ±0.01
133.3	1.33 ±0.02

Table 3 Extracellular folate production.by *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* strains in folate-free culture medium

Strains	Extracellular Folate concentrations (µg/mL)
55	89.99 ±0.45
52	71.76 ±2.02
26	102.34 ±5.53
56	49.70 ±0
22	8.52 ±0
85	68.23 ±4.10
29	3.23 ±0.52
16	53.52 ±0.87
25	133.23 ±0.74
27	38.81±3.43
18	8.81±0.45
50	91.46 ±1.57
54	66.76 ±6.84
23	43.82 ±0
49	75.87±3.96
Negative control	22.35 ±0.87

Table 4 Extracellular folate production.by *Streptococcus thermophilus* strains in folate-free culture medium.

Strains	Extracellular Folate concentrations (µg/mL)
79	24.99 ±2.10
Y106	14.40 ±2.10
Y19	8.52 ±2.10
Y109	61.46 ±4.88
K72	28.52 ±0
K55	24.11 ±5.01
Y75	2.93 ±0.45
R57	44.40 ±1.57
R34	19.70 ±2.62
K73	90.29 ±0.52
B170	6.76 ±0.52
K47	74.11 ±1.87
Negative Control	61.53 ±9.53

۳-۲- تولید فولات خارج سلولی در FACMتوسط باکتری‌های اسید لاکتیک

پس از ٤٨ ساعت رشد باکتری های اسید لاکتیک در محیط کشت اختصاصی، از میان باکتری های *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس* شماره‌های ۲۵ و۲٦ (۱۳۳,۲۳µg/mLو ۱۰۲,۳٤µg/mL) بالاترین و سویه‌های شماره ۲۹، ۲۲ و۱۸ کمترین (۳,۲۳ µg/mL و ۸,۵۲ µg/mL و۸,۸۱ µg/mL) میزان تولید فولات خارج سلولی را داشتند(جدول ۳).

همچنین در بین باکتری های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* به ترتیب شماره‌های K73 و K47 (۹۰,۲۹ µg/mL ، ۷٤,۱۱ µg/mL) بالاترین و سویه‌های Y75 ، B170 و Y19 (۲,۹۳ µg/mL ، ٦,۷٦ µg/mL ، ۸,۵۲ µg/mL)کمترین میزان تولید را به خود اختصاص داده بودند(جدول ٤). در غربالگری باکتری های *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه لاکتیس* سویه شماره ۷۳ با میزان ۳۹,۷۱µg/mL و سویه شماره ٦۵ با میزان ۳,۵۲ µg/mL ، به ترتیب بالاترین و کمترین میزان تولید را داشتند (جدول ۵). همچنین ارزیابی میزان تولید فولات خارج سلولی در باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* نشان داد که سویه های شماره ۸۷ و ۸٦ به ترتیب بالاترین (۱۷,۹٤ µg/mL) و کمترین (۲,۲ µg/mL) میزان تولید را داشتند(جدول ٦).

Table 5 Extracellular folate production.by *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis* strains in folate-free culture medium.

Strains	Extracellular Folate concentrations (µg/mL)
63	33.53 ±1.56
73-1	34.40 ±23.10
69	37.95 ±4.31
73	39.71±26.46
66	10.43 ±3.59
65	3.52 ±2.02
68	25.29 ±9.09
71	17.64 ±7.07
62	29.7 ±2.10
64	12.05 ±3.24
67	9.40 ±2.91
73-2	32.63 ±4.25
75	39.70 ±6.42
Negative Control	31.17 ±3.96

Table 6 Extracellular folate production.by *Lactobacillus helveticus* strains in folate-free culture medium.

Strans	Extracellular Folate concentrations (µg/mL)
82	9.99 ±1.34
86	2.2 ±0.68
87	17.94 ±3.72
Negative Control	58.23 ±2.51

بر اساس مطالعات مشخص شده است که سویه های خاصی از باکتری‌های اسید لاکتیک قادر به سنتز طبیعی مشتقات فولات هستند. از این رو نه تنها توانایی برخی از گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک مهم صنعتی مانند *لاکتوباسیلوس لاکتیس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در تولید این ویتامین گروه ب به اثبات رسیده است.، بلکه باکتری‌های‌اسیدلاکتیک دیگر مانند *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس رئوتری*، *لئوکونوستوک لاکتیس*، *پروپیونی باکتریوم* و *بیفیدیوباکتریوم* به صورت بالقوه نیز توانایی تولید این ویتامین را دارند[۲۵-۲۱].

با این حال، امروزه مشخص شده است که گونه‌های باکتریایی خاصی پتانسیل تولید فولات را دارند، اما با توجه به اینکه این ویژگی یک ویژگی وابسته به سویه است، بنابراین غربالگری سویه‌ها برای یافتن سویه مناسب که به صورت بالقوه قادر باشد در مقادیر کافی این ویتامین ضروری را تولید کند، ضروری به نظر می رسد [۲۱].

۳-۳- نقش منشاء باکتری های اسید لاکتیک در غربالگری سویه های تولید کننده فولات خارج سلولی

در این مطالعه ٤٧ سویه از خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک مورد بررسی قرار گرفت که هرکدام از این سویه‌ها از منشا خاصی جداسازی شده بودند (جدول ۱). باتوجه به اینکه تمام باکتری‌های مورد مطالعه در این پژوهش از ماست یا در طی فرآیند تولید ماست(کشک محلی و فرآیند کره مسکه) جداسازی شده بودند، بنابراین؛ توضیحات ذیل نشان می‌دهد که چرا برخی از محصولات لبنی تخمیر شده، از جمله ماست، حاوی مقادیر بیشتری فولات نسبت به محصولات لبنی تخمیر نشده هستند، به طوری که با تخمیر میکروبی در شیر، مشتقات فولات می‌تواند به میزان بیشتری سنتز شود.

از ۱۲ سویه *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*که مورد بررسی قرار گرفتند،تمامی سویه‌ها قادر به تولید فولات بودند ، اما تنها ۲ سویه آن بالاترین میزان تولید فولات (K73 و K47) را داشت، که تا حدودی یک نتیجه قابل انتظار بود زیرا قبلاً نشان داده شده بود که بسیاری از سویه‌های این گونه می‌توانند فولات تولید کنند [٢٦]. اما نتیجه جالب در این مطالعه میزان فولات خارج سلولی در مقادیر بالا توسط باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس* بود بطوری که این باکتری در تعداد بیشتر و با مقادیر بالاتر نسبت به باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس فولات خارج سلولی تولید کرده بود*. در میان باکتری‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس* (از ۱۵ سویه بررسی شده) ۲ سویه بطور مشخص (۲۵ و٢٦) توانستند در شرایط مشابه مقادیر بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم برمیلی لیتر، فولات خارج سلولی تولید کنند، که میزان تولید قابل توجهی می باشد. پیش از این تصور می‌شد که باکتری *استرپتوکووس ترموفیلوس* تولید کننده اصلی مشتقات فولات می‌باشد[٢٦]، و باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس*، فولات را به منظور رشد خود در فرآورده‌های لبنی تخمیری مصرف خواهدکرد [۲۳، ۲۷و ۲۸]. نتایج حاصل از این مطالعه مشابه غربالگری باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس* در فرآورده های لبنی تخمیری کشور آرژانتین می‌باشد که در آن نژادهایی از باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه*

بولگاریکوس قادر به رشد در محیط کشت فاقد فولات بوده و همچنین قادر به تولید سطوح بالایی از فولات بودند[۲۹].

همچنین از میان ۱۳ سویه باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس* مورد بررسی در این مطالعه همه سویه‌ها هرچند به مقدار کم توانایی تولید فولات خارج سلولی را داشتند. این درحالیست که فقط ۳ سویه از باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* توانایی تولید فولات خارج سلولی را هر چند در مقادیر کمتر نسبت به سایر سویه ها در این مطالعه از خود بروز دادند. تولید مقادیر کمتر فولات خارج سلولی برای این باکتری منطبق بر مطالعه‌ای است که طی آن مشخص شد *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* CD6 جدا شده از شیر تخمیر شده فقط توانایی تولید یکی از مشتقات اسید فولیک یعنی همان کواتروفولات(5-MTHF) را دارد[۳۰].

درمطالعات متعدد مشخص شده است که باکتری‌های اسید لاکتیک صنعتی مانند *لاکتوباسیلوس لاکتیس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* توانایی سنتز فولات را دارند. همچنین مقدار اسید فولیک موجود در شیر گاو از ۲۰ تا ٦۰ میلی‌گرم در لیتر متغیر است، در حالی که غلظت آن در ماست بسته به کشت اولیه و شرایط نگهداری ممکن است تا مقادیر بالاتر از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش یابد[۳۱].

لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، گونه‌هایی از باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که معمولاً به عنوان کشت آغازگر در تهیه انواع محصولات لبنی تخمیری مانند ماست، پنیر و سایر محصولات شیر تخمیر شده مورد استفاده قرار می گیرند. سطح فولات در ماست به سویه *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* استفاده شده بستگی دارد. اگرچه رشد در محیط عاری از فولات ثابت نمی‌کند که این باکتری‌ها آن را تولید می‌کنند، با این حال، در بسیاری از پژوهش‌ها به اثبات رسیده است که توانایی کشت‌های آغازگر میکروبی برای تولید یا استفاده از فولات به طور قابل توجهی متفاوت است به طوریکه این صفت، صفتی وابسته به سویه باکتری مورد استفاده می باشد. امروزه مشخص شده است که نه تنها کشت آغازگر ماست توانایی تولید فولات را دارند بلکه سایر باکتری های اسید لاکتیک نیز این خاصیت مهم را می توانند داشته باشند [۳۲].

یکی دیگر از دلایل انتخاب این سویه ها در این مطالعه، ارزیابی فولات تولید شده بر مبنای فولات خارج سلولی است. امروزه مشخص شده است برخی از سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک فولات داخل سلولی تولید می نمایند. یک مثال بارز در این مورد باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس* است، به طوری که تا ۹۰٪ از کل فولات تولید شده درون سلولی بصورت مشتقات 5,10-methenyl-THF و احتمالا 10-formyl-THF باقی خواهد ماند [۳۳]. این در حالی است که باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، مقدار بسیار کمتری از کل مشتقات فولات تولید شده را به صورت درون سلولی تولید خواهد کرد. این تفاوت‌ها در تولید مشتقات فولات داخل و خارج سلولی احتمالا در ارتباط با نحوه توزیع با طول متفاوت دم پلی‌گلوتامیل در مشتقات فولات تولیدی در دو میکروارگانیسم قابل توضیح است .تصور می‌شود یکی از وظایف اصلی دم پلی گلوتامیل حفظ فولات در داخل سلول است. علاوه بر این، در باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، توزیع مشتقات فولات به صورت درون و خارج سلولی تحت تأثیر pH نیز قرار می گیرد. سلول هایی که در pH پایین رشد کرده‌اند، نسبت تولید مشتقات فولات خارج سلولی بیشتری در برابر سلول‌هایی که در pH بالا کشت شده‌اند، دارند به طوری که در pH داخل سلولی پایین، غلظت بالاتری از مشتقات فولات پروتونه می‌شوند که در نتیجه آن انتقال در سراسر غشاء سلولی افزایش خواهد یافت [۳۳]. در تایید اثر pH همچنین تحقیقات نشان داده‌اند درماست‌های تولید شده با سویه های *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* زمان تخمیر (مدت گرمخانه گذاری) می‌تواند یکی از مهمترین عوامل در میزان تولید مشتقات فولات خارج سلولی باشد[۲۰].

دلیل دیگری که ممکن است احتمالا باعث تولید مشتقات فولات خارج سلولی توسط سویه‌های مورد مطالعه در این پژوهش باشد وجود رابطه همزیستی در سویه‌های جداشده از ماست (*لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*) است[۳٤]. به طوری که پیش از این در مطالعات مشابه مشخص شده است *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* حاوی آنزیم‌های لازم برای تولید پارا آمینو بنزوئیک اسید (PABA) و فولات می‌باشد، بنابراین به صورت طبیعی ماست به عنوان منبعی غنی از پارا آمینوبنزوئیک اسید در نظر گرفته می‌شود. وجود این مشتقات در سطوح بالا در ماست احتمالا می‌تواند

حاکی از برآیند رشد و همزیستی *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در هنگام کشت همزمان با استرپتوکوکوس ترموفیلوس و در نتیجه تولید بیشتر مشتقات فولات باشد[۳۵و ۳۶].

٤- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد تولید فولات خارج سلولی در باکتری‌های اسید لاکتیک صفتی وابسته به سویه است که می‌تواند تا حد زیادی مرتبط با منشاء جدایه مورد نظر باشد. در این مطالعه تعداد بیشتری از سویه های *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس* نسبت به سایر سویه‌ها توانایی تولید فولات خارج سلولی را داشتند به طوری که میزان تولید فولات خارج سلولی در بعضی از سویه های این باکتری بسیار قابل توجه می‌باشند. توانایی تولید فولات خارج سلولی در مقادیر بالا پیش از این در مطالعات کمی به اثبات رسیده است. بطور کلی می توان گفت بسیاری از سویه‌های باکتریایی در این مطالعه به صورت بالقوه قابلیت استفاده در تولید محصولات تخمیری مختلف حاوی فولات خارج سلولی را خواهند داشت که به عنوان ابزاری کارآمد برای جلوگیری از کمبود جذب فولات در کشورهایی که برنامه‌های غنی‌سازی فولات در آن‌ها وجود ندارد می توانند به کار گرفته شوند.

٥- سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد (۳/۵۱۷۵۹) استخراج شده است. بدینوسیله مراتب تشکر صمیمانه از کلیه کسانی که در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش یاری نمودند، اعلام می داریم.

٦- منابع

[1] Gregory JF III (1989) Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. Adv Food Nutr Res 33:1–101

[2]Tamura T, Mizuno Y, Johnson KE & Jacob RA 1997.Food folate assay with protease, alpha-amylase and folate conjugase treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 135–139.

[3]Shrestha AK, Arcot J & Paterson J 2000 Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected Lactobacillus casei. *Food Chemistry* 71 545–552.

[4] Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Fuchs, C., Rosner, B.A., Speizer, F.E. and Willett, W.C., 1998. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. Annals of internal medicine, 129(7), pp.517-524.

[5] Gordon, D., 1999. Epidemiologic evidence underscores role for folate as foiler of colon cancer. Gastroenterology 116, 3.

[6] Duthie, S.J., Narayanan, S., Brand, G.M., Pirie, L. and Grant, G., 2002. Impact of folate deficiency on DNA stability. *The Journal of nutrition*, *132*(8), pp.2444S-2449S.

[7] Nazki, F.H., Sameer, A.S. and Ganaie, B.A., 2014. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*, *533*(1), pp.11-20.

[8]Hanson, A.D., Gage, D.A. and Shachar-Hill, Y., 2000. Plant one-carbon metabolism and its engineering. *Trends in plant science*, *5*(5), pp.206-213.

[9] Scott, J., Rébeillé, F. and Fletcher, J., 2000. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), pp.795-824

[10] Cossins EA. The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. Can J Bot 2000;78(6):691–708.

[11] Bates, C.J., 1993. Folic acid. In: Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J. (Eds.), Encyclopedia of Food Science Food Technology and Nutrition. Academic Press, London, pp. 1936–1944.

[12] De Bree, A., Van Dusseldorp, M., Brouwer, I.A., Van het Hof, K.H. and Steegers-Theunissen, R.P.M., 1997. Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. *European Journal of Clinical Nutrition*, *51*(10), p.643.

[13] Menard, M.K., 1997. Vitamin and mineral supplement prior to and during pregnancy. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, *24*(3), pp.479-498.

[14] Renner, E., 1983. *Milk and dairy products in human nutrition*. VV-GmbH Volkswirtschaftlicher Verlag.

[15] Sybesma, W., Starrenburg, M., Kleerebezem, M., et al., 2003a. Increased production of folate by metabolic engineering of Lactococcus lactis. Applied and Environmental Microbiology 69, 3069–3076.

[16] Haji Mohammadi Farimani.R, Habibi Najafi M.B, Fazli Bazaz Bibi.S, Adaltian

M.R, Bahrami A.R. 1396. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional yogurts of Razavi Khorasan nomads. Iranian journal of food science and industry, 14 (63):50-41.

[17] Ghiamati, F., Yavarmanesh, M., Khomeiri, M. and Maghsoudlou, Y., 2016. Biodiversity and origin of the microbial populations isolated from Masske, a traditional Iranian dairy product made from fermented Ewe's milk. *International Journal of Dairy Technology*, *69*(3), pp.441-451.

[18] Screening and Identification of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian kishk(khorasan province) and characterization of exopolysaccharide.

[19] Arcot J & Shrestha J 2005 Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology* 16 253 266.

[20] Laiño, J.E., del Valle, M.J., de Giori, G.S. and LeBlanc, J.G.J., 2013. Development of a high folate concentration yogurt naturally bio-enriched using selected lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, *54*(1), pp.1-5.

[21] Crittenden, R.G., Martinez, N.R. and Playne, M.J., 2003. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. International journal of food microbiology, 80(3), pp.217-222.

[22] Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Pandey, A., Nampoothiri, K., 2010. Folate-producing lactic acid bacteria from cow's milk with probiotic characteristics. International Journal of Dairy Technology 63, 339–348.

[23] LeBlanc, J.G., Laiño, J.E., del Valle, M.J., Vannini, V.V., van Sinderen, D., Taranto, M.P., de Valdez, G.F., de Giori, G.S. and Sesma, F., 2011. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria–current knowledge and potential applications. Journal of applied microbiology, 111(6), pp.1297-1309.

[24] Lin, M.Y. and Young, C.M., 2000. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 10(5-6), pp.409-413.

[25] Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., et al., 2007. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. Applied and Environmental Microbiology 73, 179–185.

[26] Iyer R, Tomar S, Kapila S, Mani J, Singh R (2010) Probiotic properties of folate producing Streptococcus thermophilus strains. Food Res Int 43:103–110

[27] Rao, D.R., Reddy, A.V., Pulusani, S.R. and Cornwell, P.E., 1984. Biosynthesis and utilization of folic acid and vitamin B12 by lactic cultures in skim milk. *Journal of Dairy Science, 67(6),* pp.1169-1174.

[28] Kneifel W, Erhard F, Jaros D (1991) Production and utilization of some water-soluble vitamins by yogurt and yogurt-related starter cultures. Milchwissenschaft 46:685–690

[29] Laiño JE, LeBlanc JG, Savoy de Giori G (2012) Production of natural folates by lactic acid bacteria starter cultures isolated from artisanal Argentinean yogurts. Can J Microbiol 58:581–588

[30] Ahire, J.J., Mokashe, N.U., Patil, H.J. and Chaudhari, B.L., 2013. Antioxidative potential of folate producing probiotic Lactobacillus helveticus CD6. *Journal of food science and technology*, *50*(1), pp.26-34.

[31] Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal 12, 91–109.

[32] LeBlanc, J.G., Pı´a Taranto, M., Molina, V., Sesma, F., 2010a. B-Group vitamins production by probiotic lactic acid bacteria. In: Mozzi, F., Raya, R., Vignolo, G. (Eds.), Biotechnology of Lactic Acid Bacteria:Novel Applications. Wiley-Blackwell Ames, IA, pp. 211–232.

[33] Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M.H., Hugenholtz, J., 2003b. Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology 69, 4542–4548.

[34] Reddy, K.P., Shahani, K.M. and Kulkarni, S.M., 1976. B-complex vitamins in cultured and acidified yogurt. *Journal of Dairy Science*, *59*(2), pp.191-195.

[35] Igarashi, K. and Kashiwagi, K., 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications*, *271*(3), pp.559-564.

[36] van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., Robert, C., Oztas, S., Mangenot, S., Couloux, A. and Loux, V., 2006. The complete genome sequence of Lactobacillus Bulgaricus reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(24), pp.9274-9279.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Screening of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products of Khorasan regarding extracellular folate production

Hossseini, F. [1], Habibi Najafi, M. B. [2*], Edalatian Dovom, M. R. [3]

1. M.Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 06/ 08
Accepted 2022/ 12/ 01

Keywords:

Extracellular folate,
Microbial assay,
Streptococcus thermophilus,
Lactobacillus delbroki subspecies Bulgaricus,
Lactobacillus delbrucci subspecies Lactis,
Lactobacillus holoticus.

DOI: 10.22034/FSCT.19.130.37
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.4.3

*Corresponding Author E-Mail:
habibi@um.ac.ir

ABSTRACT

Folate is a term used for a set of compounds with similar biological activities. Folate (polyglutamates) naturally contains all forms of vitamins in this family. In other words, folic acid is a form of folate that is oxidized, this compound is stable and can be absorbed by humans (monoglutamate)[1]. There are several methods for measuring folate, but due to the fact that in this study, the production of extracellular folate (Quatrofolate) was examined, so the microbial assay method was used as the main method. *Lactobacillus. rhamnosus* (ATCC7469), which is used as a sensing organism. [2,3] This method can also measure all forms of folate. In this study, 47 medical strains isolated from traditional dairy products were Special Khorasan. Traditional yogurt (12 strains of *Streptococcus thermophilus* and 15 strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, 13 strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis*, 3 strains of *Lactobacillus helveticus*) were studied. The results of this evaluation showed that both strains (25 and 26) of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* produced significant high folate concentrations (133.23 µg / mL and 102.34 µg / mL), as well as K73 strain of *Streptococcus thermophilus*, strain 73 from the strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis* and strain No.87 from the three strains of *Lactobacillus helveticus* (90.29 µg / mL, µg / mL39.71, µg / mL 17.94), were also able to produce high amounts of quatrofolate. According to this research, it was found that the isolated strains investigated in this study have a potential ability to produce extracellular folate, and the microbial assay method for measuring a sensitive vitamin such as folate in all its forms is considered an efficient and accurate method.