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- دانش‌آموخته 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 نمی‌باشدبه 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 بالاو 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.16.95.7]

۱- مقدمه

نان یکی از ارزانترین 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 ازجمله سبوس و ویتامین‌هامی‌باشد. سبوس گندمیکی از غنی‌ترین منابع غذایی فیبروالیاف گیاهی است که شامل مقادیر بالای پروتئین، کربوهیدرات، املاح معدنی و ویتامین‌های گروه Bو 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 [۲و ۱].

ویتامین B9یا اسید فولیک که با نام فولاسین و فولات نیز معروف می‌باشد، یکی از ویتامین‌های ضروری از خانواده ویتامین‌های گروهBاست 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-٤-هیدروکسی٦-متیل پترین[1](حلقه پتریدین[2]) تشکیل شده که به وسیله متیلن به پارا آمینو بنزواتی که با یک یا چند گلوتامیک اسید کنژوگه شده، باند شده است(شکل ۱)[۳].

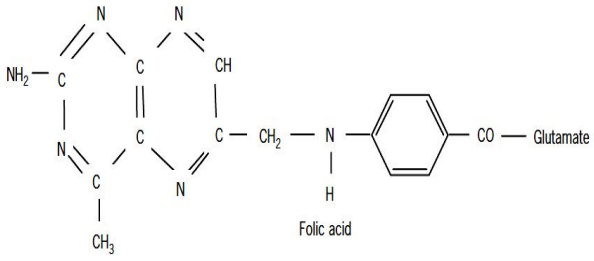

Fig 1 Folic acid structure

از اسید فولیک اغلب در دو فرم سنتزی(PGA[3]) 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[٤].

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 سرطان‌هااشاره کرد[۸-۵].مصرف اسید فولیک در دوران بارداری در پیشگیری از ناهنجاری‌های مادرزادی امری ضروری است. شایعترین ناهنجاری ناشی از کمبود این ویتامین، بیماری NTD[4] 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 نافرم 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 [۷و ۹].

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری اسید فولیک پیشنهاد شده که می توان از مهمترین آنها روش میکروبی، روش اندازه‌گیری با کروماتوگرافی و روش پیوند با پروتئین[5] را نام برد. در روش میکروبی از باکتری لاکتوباسیلوس کازئی زیر گونه رامنوسوس[6](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 مصرففولات 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].

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

3. Pteroyl glutamic acid
4. Neural tube defects
5. protein-binding assay (RPBA)
6. Lactobacillus casei-rhamnosus

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.16.95.7]

آلابوردا و همکاران (۲۰۰۸)از دو روشکروماتوگرافی با کارایی بالابا شناساگر فرابنفش[7] و روش کشت میکروبی برای اندازه‌گیری اسید فولیک سنتزی افزوده شده در آردهای بدون سبوس استفاده کردند. نتایج نشان داد که میزان اسید فولیکاندازه‌گیری شده در روش میکروبی کمی بالاتر از روشکروماتوگرافی 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 اندازه گیری 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 ٤۰۰ 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 آلداریچ خریداری گردید. محیط‌های کشت مورد استفاده و آنزیم‌های مورد استفاده در این پژوهش نیز به ترتیب از شرکت مرک آلمان و سیگما آلداریچ 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 [۱٦].

به منظور غنی‌سازی نان‌ها با اسید فولیک نیز از تیمار ۱۰۰٪ نیاز روزانه به اسید فولیک[8] استفاده گردید. از آن‌جایی که میزان توصیه شده اسید فولیک برای مصرف روزانه٤۰۰ میکروگرم بوده و میانگین وزن هر نان تهیه شده در این تحقیق، ۲۰۰ گرم می‌باشد، برای انجام فرایند غنی‌سازی، مقدار٤۰۰ میکروگرم اسید فولیکرا در شرایط دور از نور خورشید توزین کرده و به۱۵۰ گرم آرد مورد استفاده برای تهیه هر نان افزوده و کاملاً مخلوط گردید، به این ترتیب در هر گرم آرد مورد استفاده ۲/٦٦ 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 میلی‌لیترآب (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 ٤۰ 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

7. high-performance liquid chromatography with fluorescence detection

8. Reference daily intake (RDI)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.16.95.7]

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. نان ها پس از سرد شدن در کیسه های 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) وشناساگر UVدر 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=۸) 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 ٤٠ غربال شدند [۱۷]سپس مقدار ۲ گرم از نمونه مورد نظر را به بشر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر بافر پتاسیم هیدوژن فسفات۰/۱مولار (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 pHمخلوط به وسیله اسید فسفریک به ٦/۹ رسانیده شده و پس از افزودن آنزیم آلفا آمیلاز حاصله از آسپرژیلوس اوریزه[9] (۱ میلی لیتر از محلول۲۵ میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر آنزیم)، به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم ٦٥ 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 ٤۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید و سپس عصاره بالایی جدا گردید [۱۷].

9. *AspergillusOryzae*

سپس به منظور استخراج اسید فولیک روی بستر جامد[10] و انجام فرایند تصفیه‌ی[11] عصاره حاصله، طبق روش واهتریستو و همکارانش(۱۹۹٦) از کارتریج SAX[12] 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 هیدوژن فسفات ۰/۱ مولار (pH =۸-۷) که حاوی ۰/۰۵ درصد وزنی/حجمی آسکوربات بود انجام شد و پس از واجد شرایط شدن کارتریج، ٤ میلی‌لیتر از عصاره‌ی حاصله از نمونه پس از سانتریفوژ کردن را، با ۲ میلی‌لیتر محلول بافر رقیق کرده و با سرعت ۰/٦ میلی‌لیتر در دقیقه وارد کارتریج کردیم. سپس کارتریج به وسیله ۲ میلی لیتر بافر رقیق شده (۰/۰۲ مولار) شستشو شد و درنهایت اسید فولیک به وسیله ٤ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار استات سدیم (pH =٤/۵) که حاوی ۵٪ وزنی/حجمی دی سدیم فسفات و ۰/۰۵ ٪ وزنی/حجمی آسکوربیک اسید است، از کارتریج خارج شده و برای تزریق به دستگاه HPLCآماده 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 HPLCمجهز به آشکارساز UVو ستون Nucleosill 100 (5 μm, 125 × 4 mm)C18منتقل گردید. برای این منظور از فاز متحرک متانول : بافر پتاسیم فسفات (pH 6.8) (KH_2PO_4 0.0035 M و K_2HPO_4 0.0032 M) به نسبت حجمی ۲۵ به ۷۵ و به صورت غیرگرادیانی[13]، 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[14] اسید فولیک در روش کروماتوگرافی

10. Solid-Phase extraction
11. Clean-up
12. Strong anion-exchange
13. Isocratic
14. Recovery of folates

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.16.95.7]

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].

$$R=(C_{found} - C_{sample}) / C_{added} \quad (۱)$$

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

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

C_{added}= مقدار اسید فولیک افزوده شده

۲-۳- 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].

۲-۳-۱- 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 (pH=۷/٤) حاوی یک درصد اسید آسکوربیک منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط دور از نور و هوا جوشانده شد[۳]. در ادامهبه مخلوط حاصل از تیمار حرارتی، ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/٤) و ۱ میلی‌لیترآنزیم پروتئاز ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزودهگردید.پس از ۳ ساعت نگه‌داریدر دمای۳۷درجه 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 آلفاآمیلاز ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به آن افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت نگه‌داری گردید. pH مخلوط با اسید کلریدریک به ٦ 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 نگه‌داری شد [۳].

۲-۳-۲- 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، ۱میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۰۸درصد ریخته و پس از همزدن، جذب محلول حاصله با دستگاه اسپکتروفتومتر در ٦۰۰ نانومتر خوانده و تا رسیدن به جذب ۰/۰۸ – ۰/۱۳ با سرم فیزیولوژی رقیق شد [۳].

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

محلول‌های استاندارد در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۸، ۰/۰٦، ۰/۰٤ و ۰/۰۲ نانوگرم در ۱میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/٤) تهیه شد. سپس در هر فالکون ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت فولیک اسید کازئی، ۱ میلی‌لیتر محلول استاندارد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول نیم مک فارلند 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 اسپکتوفتومتر در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.16.95.7]

طول موج ٦٠٠ نانومتر خوانده شد و منحنی استاندارد آنها رسم گردید [٣].

٢-٣-٤- بررسی میزان فولات نمونه‌ها توسط کشت میکروبی

به فالکون حاوی ١٠ میلی لیتر محیط کشت فولیک اسید کازئی، ١ میلی لیتر از عصاره استخراج و تصفیه شده نمونه و ١٠٠ میکرولیتر محلول نیم‌مک‌فارلند اضافه کرده و پس از قرار دادن در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٢ ساعت، میزان جذب نور آن توسط دستگاه اسپکتوفتومتری (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 [٣].

٢-٤- طرح آماری

از لحاظ آماری طرح مورد استفاده در این تحقیق در قالب کاملا تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن (در سطح معنی‌داری ٥٪) صورت گرفته و آزمایشات در ٣ تکرار انجام شد. به منظور تجزیه و تحلیل نتایج از برنامه آماری SPSSاستفاده گردید.

٣- نتایج و بحث

در شکل ٢ و ٣ به ترتیب نمودارهای استاندارد اسید فولیک به دست آمدهتوسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و روش میکروبی نشان داده شده است.

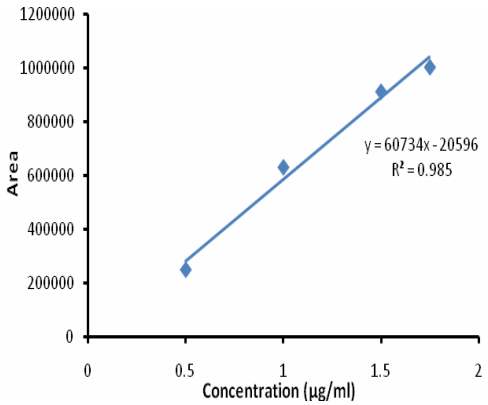

Fig 2 Standard curve of folic acid by HPLC

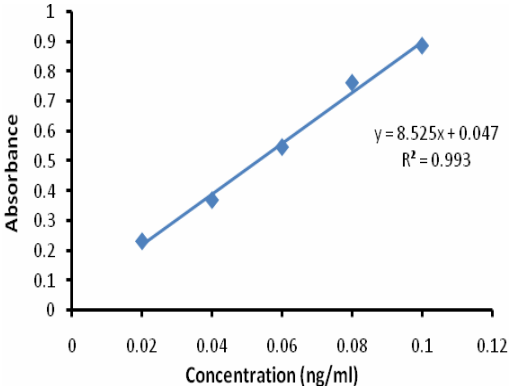

Fig 3 Standard curve of folat by microbiological assay

با مقایسه زمان بازداری وسطح زیر پیک منحنی کروماتوگرام‌های نمونه‌ها با کروماتوگرام استاندارد در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا(و با در نظر گرفتن میزان بازیابی محاسبه شده ٩٧٪ 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 ١).

همانگونه که در شکل ٤نشان داده شده است، در تمامی نمونه‌های مورد بررسی، میزان اسید فولیک اندازه‌گیری شده توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با احتساب بازیابی٩٧٪، 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 میکروارگانیسم 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 [١٩].

میزان اسید فولیک به کار برده شده به منظور غنی‌سازی در این تحقیق، ٢٦٦ میکروگرم به ازای هر ١٠٠ گرم آرد مصرفی بوده است. اما همانگونه که در جدول ١ 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.16.95.7]

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 ٤-۱ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم، اسید فولیک می‌باشد [۲۰].

Table 1 Folic acid and folatesdeterminationin samples (µg/100 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±0.4 ^{Db}	62.2±0.7 ^{Da}
Fortified Flour (7% bran+100% RDI Folic acid)	246.2±4.2 ^{Bb}	262.8±6.1 ^{Ba}
Fortified Dough (7% bran+100% RDI Folic acid)	271.1±5.1 ^{Ab}	301.3±7.3 ^{Aa}
Fortified Bread (7% bran+100% RDI Folic acid)	187.4±3.6 ^{Cb}	198.9±5.2 ^{Ca}

Means (± standard deviation) within a rowwith 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 $p< 0.05$.

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 (۳۹٦ 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.

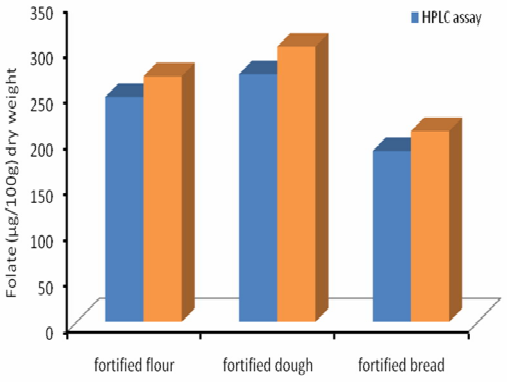

Fig 4 The changing in folate content samples during bread making by HPLC method and microbiological assay.

٤- 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 درنان 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 محتویا 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.16.95.7]

۵- منابع

[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 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, SH., Determination and comparison of folic acid in fortified wheat flours and breads by high performance liquid choromatography (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 breadFood 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 products1Published 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.,Lehikoinen, 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.16.95.7]

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 scienceand 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 acidisone of the essential vitaminsthat deficiency of it causes congenital malformations in pregnant, especially neural tubedisorders.Sincethe humanbody cannot synthesize this vitamin, enrichment process on bread that isknown as one of themost widely consumedfoodsinthe dietof our people, can be one an effectivestepforeliminatingdefectscaused byvitamin's deficiencyinpeople. Considering the health effects of wheat bran and the presence of folic acid in it, in this studyattemptstofortify flour (with 7% wheat bran)by100% RDI folic acid and then measuringthestability offolic acidinbreadmaking process by HPLC method and microbiological assay. The resultsindicated 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 folatein 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 processto providefolic acidrequirements inadults.

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.16.95.7]

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