مقایسه میزان اسید فولیک تولید شده در ماست پروبیوتیک و ماست معمولی حاصل از شیر گاو، شیر گوسفند و شیر بز

الناز تمسکنی زاهدی[a*]، محمدرضا احسانی[b]، عزیز همایونی راد[c]، انوشه شریفان[d]،کامبیز لاریجانی[e]

[a] کارشناس ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[b] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[c] استادیار تکنولوژی مواد غذایی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[d] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[e] استادیار گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۶/۱۷

چکیده

مقدمه: در سال های اخیر استفاده از محصولات پروبیوتیک به دلیل اثرات سلامتی بخش برای مصرف کنندگان رو به افزایش است. یکی از این خواص، تولید ویتامین‌های گروه ب خصوصا اسید فولیک و مشتقات آن توسط باکتری‌های پروبیوتیک می باشد. در این پژوهش میزان افزایش اسید فولیک در ماست معمولی و ماست پروبیوتیک حاوی گونه بومی مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: جهت تهیه ماست از سه نوع شیر گاو، گوسفند و بز استفاده شده است. در این پژوهش از باکتری‌های ماست معمولی (YC-X11) و لاکتوباسیلوس کازئی (y2b4, JQ41273501) استفاده شد. نمونه‌های ماست در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت چهار ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. اسید فولیک تولید شده در مدت زمان تخمیر و ۱۴ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس توسط دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. هم چنین تغییرات اسیدیته و pH و ارزیابی حسی در روز اول، هفتم و چهاردهم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: توانایی تولید اسید فولیک توسط باکتری پروبیوتیک بومی در تمام نمونه ماست حاصل از سه نوع شیر گاو، گوسفند و بز مشاهده شد. میزان اسید فولیک تولید شده در ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک بیشتر از ماست معمولی بود ($p<۰/۰۵$). تغییرات pH در مدت نگهداری روند نزولی داشته و اسیدیته در طول مدت ۱۴روز نگهداری افزایش یافته است.

نتیجه‌گیری: باکتری بومی لاکتوباسیلوس کازئی توانایی افزایش اسید فولیک تا سه برابر میزان تولید شده در ماست معمولی را دارا می باشد هم چنین باکتری پروبیوتیک مورد آزمایش در این پژوهش خواص نامطلوبی در ماست ایجاد نکرد و محصول مناسبی تولید شده است.

واژه‌های کلیدی: *اسید فولیک، اسیدیته، باکتری پروبیوتیک بومی، لاکتوباسیلوس کازئی، ماست پروبیوتیک*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: t.zahedi_elnaz@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

اسید فولیک یا پتروئیل گلوتامیک اسید یکی از مهم‌ترین ویتامین‌هایی است که بدن قادر به تولید آن نمی‌باشد. در بدن انسان اسید فولیک یا ویتامین ب۹ از طریق مواد غذایی تامین می‌شود. اسید فولیک نقش بسیار مهمی در متابولیسم سلولی از جمله رونویسی DNA، سنتز نوکلئوتیدها، ویتامین‌ها و اسیدهای‌آمینه را دارا می باشد. کمبود اسید فولیک در بدن باعث بیماری کم‌خونی زیان آور، ابتلا به سرطان و یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌ها، نقص در بسته شدن لوله عصبی نوزادان (بسته شدن ناقص طناب و ستون نخاعی می‌باشد) است، که سالانه منجر به مرگ نوزادان زیادی قبل و بعد از تولد می‌شود (Leblance *et al*., 2010; Rossi, 2011). میزان اسید فولیک مورد نیاز روزانه بر اساس ضوابط FAO، ۴۰۰ میکروگرم می‌باشد (FAO/WHO, 2001). تاثیر پروبیوتیک بر فلور میکروبی دستگاه گوارش و ایفای نقش درمانی آن ها به مقدار مصرف روزانه این باکتری همراه با غذا مربوط می‌باشد. بر اساس استانداردها برای بروز ویژگی‌های سلامتی بخش پروبیوتیک ها باید 10^7 cfu از این باکتری‌ها در هر گرم از محصول پروبیوتیک وجود داشته باشد (Sarrala *et al*., 2000). شیر و فرآورده‌های آن به دلیل دارا بودن بسیاری از مواد مغذی ضروری، از جمله پروتئین، کربوهیدرات، مواد معدنی و ویتامین‌ها، محیط مناسب جهت رشد باکتری‌های پروبیوتیک است. در بین محصولات تخمیری شیر، ماست در بسیاری از کشورها از محبوبیت و مصرف سرانه بیشتری برخوردار است (Sarkar, 2008). در بیشتر نقاط جهان از شیر گاو ماست تهیه می‌شود و تهیه ماست از شیر بز و شیر گوسفند با استفاده از باکتری پروبیوتیک بر ارزش تغذیه‌ای آن افزوده و ایجاد تنوع در محصولات پروبیوتیکی را رواج می‌دهد. نتایج حاصل از پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند، باکتری‌های مایه ماست باعث افزایش میزان اسید فولیک و فولات موجود در ماست می‌شوند. میزان اسید فولیک موجود در شیر ۴۰-۱۰ میکروگرم بر لیتر می‌باشد، در حالی که میزان اسید فولیک ماست بسته به باکتری مورد استفاده برای تولید ماست به بالای ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر افزایش می‌یابد (Leblanc *et al*., 2007; Park *et al*., 2007). باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی تولید فولات را دارا می‌باشند و میزان اسید فولیک و فولات تولید شده بسته به نوع باکتری متفاوت می‌باشد. تولید فولات توسط چند نوع مختلف از باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس (*Streptococos thermophillus*) مورد بررسی قرار گرفته است. باکتری استرپتوکوکوس بین ۵۹-۴۷ نانوگرم بر میلی لیتر فولات تولید کردند که این میزان تقریبا دو تا سه برابر مقدار اولیه اندازه‌گیری شده در شیر قبل از گرم خانه‌گذاری و تخمیر می‌باشد (Lin & Young, 2000). در تحقیق دیگر توانایی تولید فولات توسط ۷ گونه از باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس به طور منفرد در شیر بدون چربی مورد آزمایش قرارگرفت که میزان اسید فولیک تولید شده در حدود ۶۰-۱۰ نانو گرم بر لیتر گزارش شد. در حالی که باکتری‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس مورد آزمایش توانایی تولید فولات را نداشتند (Crittenden *et al*., 2003). محققان از شیر گاو، باکتری‌های گونه لاکتوباسیلوس با خواص پروبیوتیکی را جداسازی کردند. از این میان، ۲ گونه توانایی تولید فولات را در محیط کشت حاوی شیر بدون چربی دارا بودند که مقدار فولات آن ها بین ۱۴/۵-۱۲/۵ بود (Ganhadran *et al*., 2010). با این حال هنوز پژوهش‌های کافی در خصوص قابلیت باکتری‌های پروبیوتیک در تولید این ترکیبات انجام نگرفته است. به صورت آزمایشگاهی تحقیقات مختلفی بر روی گونه‌های مختلف لاکتوکوکوس (*Lactococcos*)، لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*)، پروپیونی باکتریوم (*Propionibacterium*)، بیفیدوس (*Bifidus*) و سترپتوکوکوس (*Streptococcus*) از نظر توانایی در تولید فولات انجام شده است که در بین آن ها باکتری‌های لاکتوباسیلوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس به میزان ۲۹۱-۵۷ میکروگرم بر لیتر، استرپتوکوکوس ترموفیلوس به میزان ۲۰۲-۲۹ میکروگرم بر لیتر (Sybesma *et al*., 2003) پروپیونی باکتریوم جانسنی به میزان ۴۰ نانو گرم برگرم (Hogenholtz *et al*., 2002) و لاکتوباسیلوس کازیی ۷۰-۶۰ نانو گرم بر گرم (Crittenden *et al*., 2003; Wouters *et al*., 2002) بالاترین میزان تولید را دارا می‌باشند. تولید فولات توسط باکتری لاکتوباسیلوس برویس (*Lactobacillus brevis*)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*)، لاکتوباسیلوس سانفرانسیسکسیس (*Lactobasillus sanfransiscesis*)

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobasillus acidophillus*) و لاکتوباسیلوس روتری (*Lactobasillus reotri*) گزارش شده است (Santos *et al*., 2008). در چند سال گذشته به باکتری های پروبیوتیک جداسازی شده از محصولات سنتی توجه زیادی شده است و خواص فیزیکو شیمیایی و حسی آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفته است (خمیری و همکاران، ۱۳۸۷). تحقیقات گسترده‌ای بر روی خواص مختلف این باکتری‌ها از جمله کاهش کلسترول و تولید CLA (اسید لینولئیک مزدوج) در کشور انجام شده است. در حالی که توانایی تولید ویتامین‌های گروه ب خصوصا اسید فولیک و فولات توسط باکتری‌های پروبیوتیک به صورت آزمایشگاهی در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفته است. برخی از گونه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده از محصولات تخمیری استان ایلام و لرستان توانایی تولید فولات به میزان ۵۵ میکروگرم بر لیتر تا ۶۶ میکروگرم بر لیتر را دارا می‌باشند (Dana *et al*., 2010). با توجه به توانایی تولید باکتری پروبیوتیک بومی جهت تولید فولات این پژوهش برای اولین بار توانایی تولید باکتری پروبیوتیک را به صورت کشت مختلط با استارتر معمولی $YC\text{-}X_{11}$ در ماست مورد آزمایش قرار داده است. هدف از این پژوهش اندازه‌گیری اسیدفولیک در ماست و بررسی ویژگی‌های آن در محصول می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق گامی به سوی تحقیقات بیشتر جهت استخراج باکتری‌های پروبیوتیک بومی و مصرف آن‌ها به عنوان باکتری‌های آغازگر تخمیر در صنعت و تأمین بخشی از اسید فولیک مورد نیاز روزانه بدن به طور طبیعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- باکتری‌های مورد استفاده

برای تهیه ماست معمولی از باکتری YC-X11 که به صورت DVS از شرکت هانسن، استفاده شد. برای تهیه ماست پروبیوتیک علاوه بر باکتری مایه ماست از گونه باکتری جداسازی شده از محصولات تخمیری شیر استفاده شد که از گونه لاکتوباسیلوس کازئی به شماره y2b4, JQ41273501 و تهیه شده از کلکسیون باکتری خانم دکتر تاج‌آبادی می‌باشد.

- آماده‌سازی باکتری پروبیوتیک

باکتری پروبیوتیک بومی (*Lactobassilus casei*) خالص و لیوفیلیزه تهیه شده و در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع (Merck Germany) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت فعال شدند. سپس نمونه‌های حاصل در ۹۵ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع تلقیح داده شد و تحت شرایط فوق تکثیر شدند. بیومس حاصل به وسیله سانتریفوژ g ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ جداسازی شد و در ۲ مرحله با محلول استریل ۰/۱ درصد آب پپتونه شسته شدند (Brinques & Ayub, 2011; Zanjani *et al*., 2012).

- تهیه ماست

ماست مورد آزمایش از شیر کامل به روش پیشنهادی تشریح شده در کتاب ماست (Tamim & Rabinson) انجام شد. در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده و در حین حرارت دادن به منظور افزایش و یکسان سازی ماده خشک مقدار معین شده شیر خشک به آن افزوده شد. سپس شیرها تا دمای ۴۲ خنک شدند. برای تهیه ماست معمولی از محیط کشت $YC\text{-}X_{11}$استفاده شد (Tamime & Rabinson, 1999). برای تهیه ماست پروبیوتیک سوسپانسیون باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بومی به نسبت ۱ درصد به شیر حاوی باکتری استارتر ماست افزوده و در دمای همان دما به مدت چهار ساعت گرم‌خانه‌گذاری صورت پذیرفت. سپس محصول خنک شده در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند (Marakoudakis *et al*., 2006).

- استخراج اسید فولیک

آماده‌سازی نمونه‌ها: به ۵ میلی‌لیتر نمونه، ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات یک مولار حاوی ۰/۵ درصد سدیم آسکوربات افزوده و به خوبی مخلوط شد. سپس نمونه‌ها را به مدت ۱۵–۲۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۹۰ درجه سلسیوس حرارت داده شدند. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند. سپس توسط فیلتر صاف شده و در دمای ۲۰- نگهداری شدند تا زمانی که به دستگاه

Archive of SID
www.SID.ir

گروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق شوند (Lin & Young, 2000).

- اندازه‌گیری اسید فولیک توسط دستگاه HPLC

برای آنالیز اسید فولیک از دستگاه کروماتوگرافی دارای ستون c18 با طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر استفاده شد. دتکتور مورد استفاده UV-Visible و طول موج ۲۸۲ نانومتر و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. تعیین غلظت کمی اسید فولیک از طریق مقایسه منحنی کالیبراسیون استاندارد اسید فولیک و رسم منحنی کالیبراسیون نمونه‌ها انجام شد. براساس منحنی کالیبراسیون استاندارد اسید فولیک رگرسیون خطی ترسیم می‌گردد و معادله خط مربوط جهت محاسبه میزان اسید فولیک به دست می‌آید (Lin & Young, 2000).

- استاندارد اسید فولیک

اسید فولیک با درصد خلوص ۹۹٪ تولید شده توسط شرکت Sigma-Aldrich ایالات متحده تهیه شد.

- آزمون‌های شیمیایی

اندازه‌گیری pH توسط دستگاه pH متر Microprocessor مدل ۵۳۷ Weilheim آلمان براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۵۵۳ انجام شد. اندازه گیری اسیدیته بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۵۲۲۲ با استفاده از سود ۹/۱ نرمال استفاده شد. لازم به ذکر است، آزمایشات شیمیایی در سه تکرار در روزهای اول و هفتم و چهاردهم اندازه‌گیری شده‌اند.

- ارزیابی حسی

برای ارزیابی حسی یک گروه ارزیاب شامل ۱۰ نفر از افراد آموزش دیده انتخاب شدند و نمونه‌های ماست را به صورت مجزا مورد ارزیابی قرار دادند. این ارزیابی براساس یک سری مشخصات مهم از قبیل طعم، مزه و بافت و پذیرش کلی سنجیده شد و امتیازها از ۱ تا ۹ براساس طرح هدونیک ۹تایی، به ترتیب از بدترین تا بهترین حالت برای نمونه‌ها منظور شد (Kailasapathy, 2006).

- تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب یک آزمایش فاکتوریل با طرح بر پایه کاملا تصادفی انجام شد و در صورت معنی‌دار بودن تفاوت بین تیمارها از آزمون مقایسه‌ای چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد. نرم افزار مورد استفاده در این پژوهش SPSS و Excel می‌باشد.

یافته‌ها

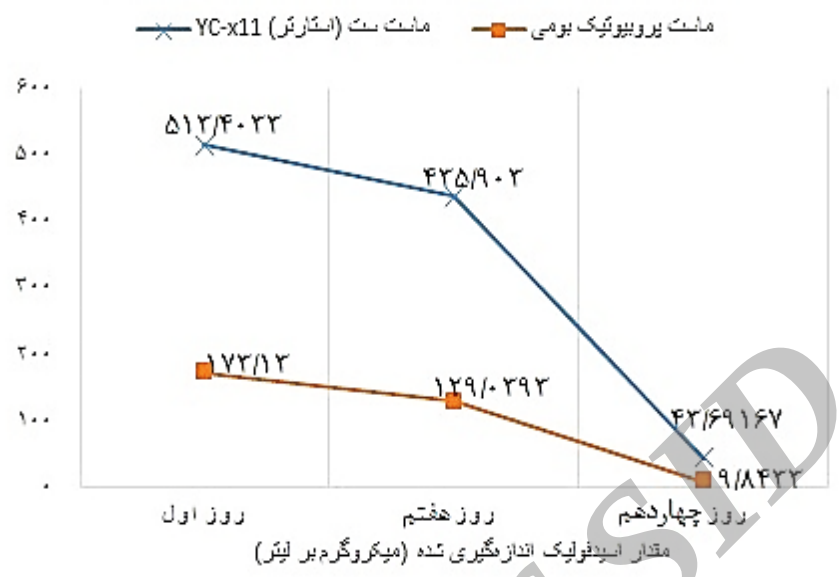
- میزان اسید فولیک تولید شده در ماست

نمودار ۱ متوسط میانگین میزان اسید فولیک تولید شده در ماست پروبیوتیک حاصل از مجموعه باکتری‌های مایه ماست و باکتری بومی گونه لاکتوباسیلوس کازئی y2b4, JQ41273501 و ماست معمولی حاصل از مایه معمولی yc-x11 را نشان می‌دهد. میزان اسید فولیک تولید شده در ماست پروبیوتیک بیشتر از ماست معمولی می‌باشد ($p<۰/۰۵$). همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، میزان اسید فولیک در طول مدت زمان نگهداری روند نزولی داشته و بقای اسید فولیک در ماست پروبیوتیک بیش از ماست معمولی می‌باشد ($p<۰/۰۵$). میزان اسید فولیک تولید شده در ماست پروبیوتیک روز اول، هفتم و چهاردهم به ترتیب۴۳/۶۹۱، ۴۳۵/۹۰۳ و ۵۱۳/۴۰۳ میکروگرم بر لیتر می‌باشد ($p<۰/۰۵$). میزان اسید فولیک تولید شده در ماست معمولی روز اول، روز هفتم، چهاردهم۹/۸۴، ۱۷۳/۱۳و ۱۲۹/۰۳۹ می‌باشد ($p<۰/۰۵$). نمودار ۲ متوسط میانگین میزان اسید فولیک تولید شده در ماست حاصل از شیر گاو و شیر گوسفند و بز را نشان میدهد. میزان اسید فولیک تولید شده در ماست حاصل از شیر گاو روز اول، هفتم، چهاردهم به ترتیب ۶/۸۱۵ ،۷۰۵ /۳۶۳، ۵۳۲/۹ میکروگرم در لیتر، در ماست حاصل از شیر گوسفند روز اول، هفتم، چهاردهم مقدار۱۹۵/۲۰ و ۳۰۰/۲۳۸،۲۱ میکروگرم بر لیتر و در ماست حاصل از شیر بز روز اول، هفتم و چهاردهم به ترتیب ۶/۸۱۵، ۱۹۰/۴۷، ۲۸۸/۶۰ میکروگرم بر لیتر می‌باشد ($p<۰/۰۵$). متوسط میانگین میزان اسید فولیک تولید شده در نمونه‌ها با تغییرات روز معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). متوسط میانگین میزان اسید

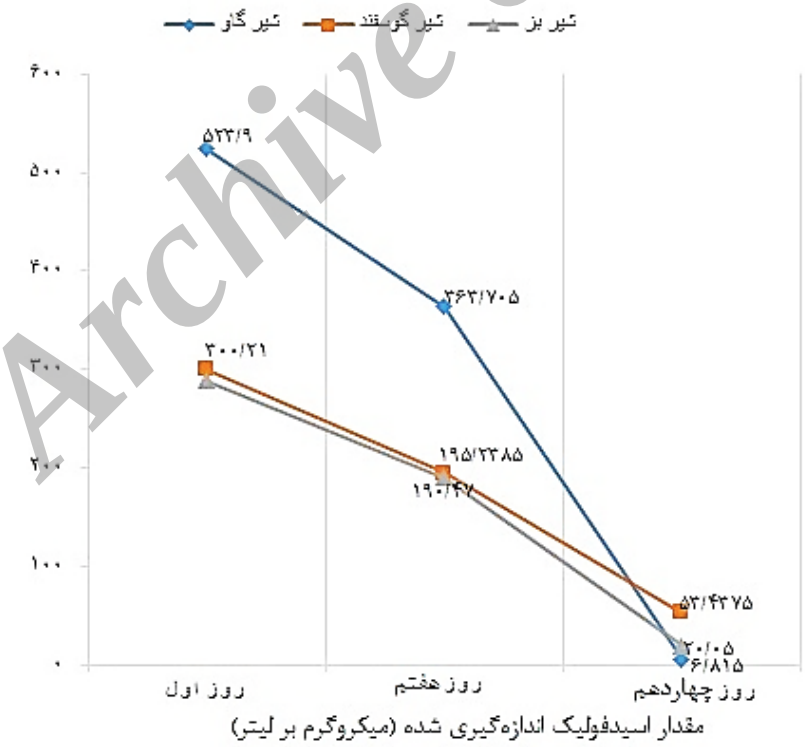
Archive of SID

www.SID.ir

فولیک تولید شده از روز اول به هفتم کاهش یافته و از روز هفتم تا چهاردهم نیز روند نزولی دارد و میزان اسید فولیک باقی مانده در روز چهاردهم بسیار ناچیز مشاهده شد ($p < ۰/۰۵$).



نمودار ۱- میانگین میزان اسید فولیک تولید شده در ماست پروبیوتیک و ماست معمولی (ست)



نمودار ۲- میانگین میزان اسید فولیک تولید شده در ماست حاصل از شیر گاو، شیر گوسفند و شیر بز

Archive of SID
www.SID.ir

- تغییرات اسیدیته در ماست

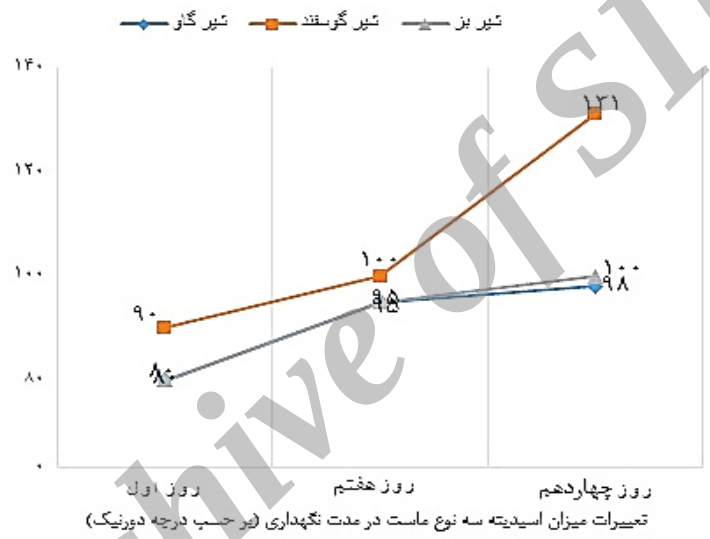
نمودار ۳ متوسط میانگین میزان اسیدیته تولید شده در ماست حاصل از شیر گاو و شیر گوسفند و شیر بز را نشان می‌دهد. همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، تغییرات اسیدیته روند صعودی داشته و بیشترین اسیدیته مربوط به ماست حاصل از شیر گوسفند می‌باشد ($p<۰/۰۵$). تغییرات متوسط میانگین میزان اسیدیته بین ماست معمولی و ماست پروبیوتیک بر طبق نتایج آماری، رابطه معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۱$).

- تغییرات pH در ماست

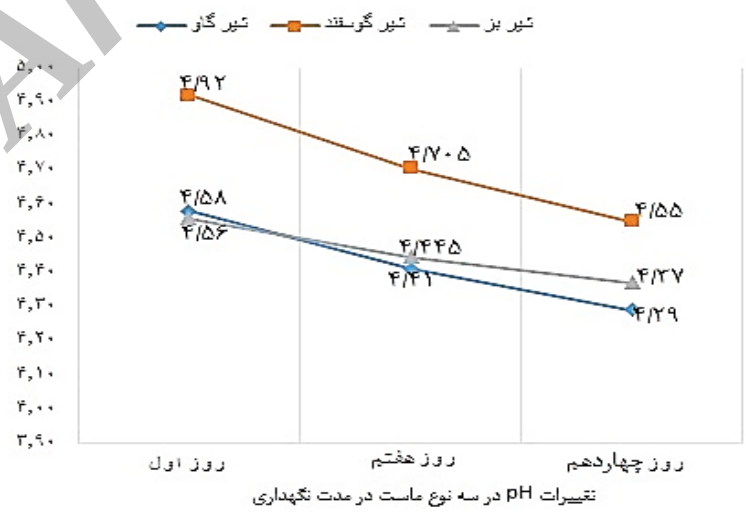
نمودار ۴ میانگین میزان pH اندازه‌گیری شده در ماست حاصل از شیرهای مختلف را نشان می‌دهد. همان طور که نمودار ۴ نشان می‌دهد تغییرات pH روند نزولی داشته است ($p<۰/۰۵$).

- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی ماست حاصل از شیرهای مختلف در نمودار ۵ و نمودار ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد، تفاوت معنی‌دار بین ماست حاصل از شیرهای مختلف در طول مدت ۱۴ روز نگهداری مشاهده می‌شود ($p<۰/۰۵$). در حالیکه طبق نتایج آماری، تفاوت معنی‌داری بین ماست معمولی و ماست پروبیوتیک وجود نداشته است ($p>۰/۰۵$).



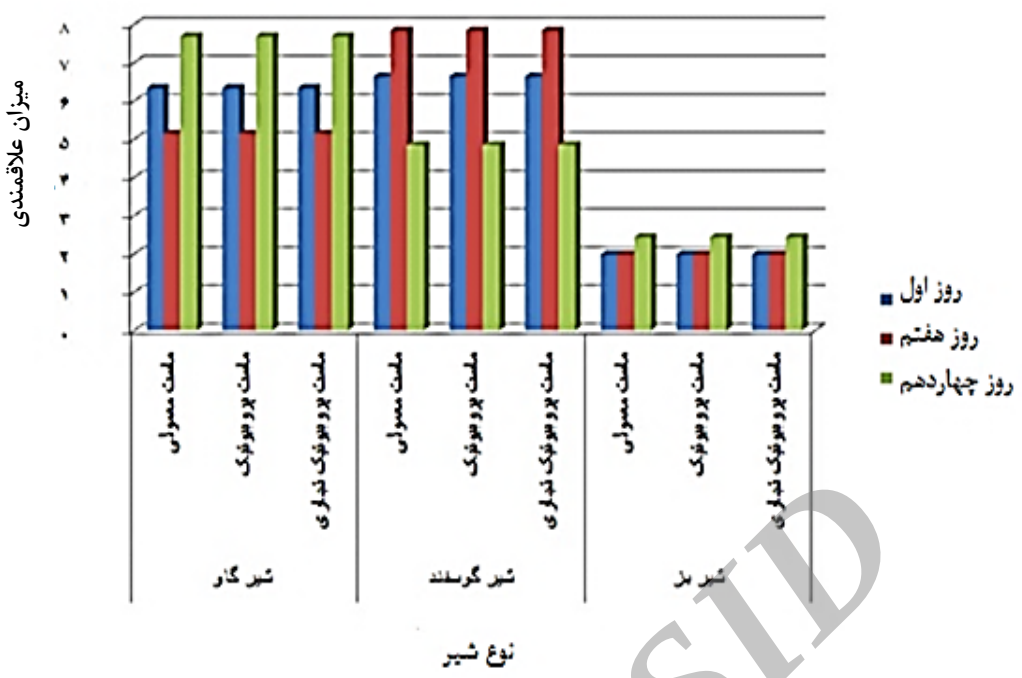
نمودار ۳- میانگین تغییرات اسیدیته در سه نوع ماست در ۱٤ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس



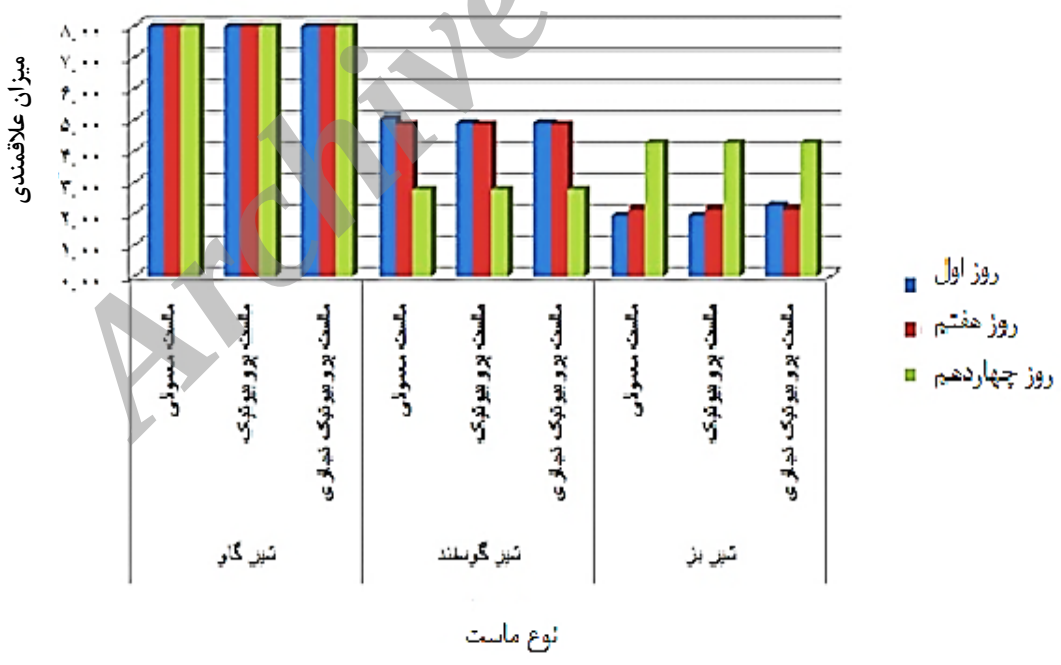
نمودار ٤- میانگین تغییرات pH در سه نوع ماست در ۱٤ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس

Archive of SID

www.SID.ir

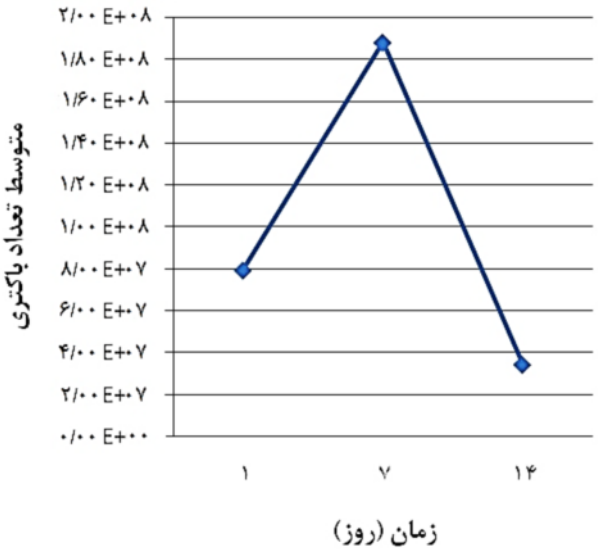


نمودار۵- مقایسه میانگین ارزیابی بافت در ماست‌های مختلف



نمودار ٦- مقایسه میانگین ارزیابی طعم در ماست‌های مختلف

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۷- میانگین تغییرات زنده مانی باکتری در مدت زمان ۱۴ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس

بحث

- میزان اسید فولیک تولید شده در ماست

براساس نتایج حاصل از این پژوهش، همان طور که نمودار ۱ نشان می‌دهد، میزان اسید فولیک تولید شده در ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک و باکتری مایه ماست به طور معنی‌داری بیشتر از ماست حاوی باکتری‌های مایه ماست است ($p<۰/۰۵$)، میزان این ویتامین در طول مدت نگهداری کاهش یافت که با نتایج پژوهش‌های پیشین مطابقت دارد (Lin & Young, 2000; Crittenden *et al*., 2002). در دهه اخیر مطالعات زیادی بر روی باکتری‌های جداسازی شده از محصولات تخمیری سنتی شیر صورت پذیرفته است و باکتری‌های پروبیوتیک با خواص قابل توجهی شناسایی و جداسازی شده‌اند. تولید ترکیباتی مانند اسید فولیک و فولات به عوامل مختلفی از جمله نسبت تولید به مصرف این ترکیبات توسط باکتری، نوع باکتری، میزان و نوع مشتقات اسید فولیک گروه متیلن (Methylen) و فرمیل (Formyl) و گلوتامات و شرایط محیطی از جمله مواد مغذی موجود در محیط و pH محیط بستگی دارد (Crittenden *et al*., 2003; Rossi *et al*., 2011). باکتری‌ها برای تولید اسید فولیک و مشتقات آن نیازمند به حضور پیش‌سازهای اسید فولیک و پاراآمینو بنزوئیک اسید (*p*-Aminobenzoic acid) می‌باشند، که از ۲ مسیر شیگیمات و تجزیه گوآنوزین تری فسفات (GTP) مهیا می‌سازند. باکتری‌ها برای توانایی مصرف این پیش‌سازها و تبدیل آنها به اسید فولیک و مشتقات آن باید توالی ژنوم تولید کننده فولات را داشته باشند (Rossi *et al*., 2011). تجزیه و تحلیل توالی ژنوم باکتری لاکتوباسیلوس، نشان می‌دهد تمام باکتری‌های لاکتوباسیلوس توانایی تولید پارا آمینو بنزوییک اسید را که یکی از پیش‌سازهای تولید اسید فولیک می‌باشد دارا نیستند (Rossi *et al*., 2011). جهت تولید این ویتامین‌ها وجود آنزیم برای شروع واکنش شیگیمات ضروری است. به نظر می‌رسد این آنزیم در غیاب اسید فولیک و فولات نمی‌تواند در باکتری‌های یاد شده توانایی تولید این ترکیب را در حد قابل توجهی ایجاد کنند. اسید فولیک در اوایل دوران شیردهی در شیر به میزان ۴۰-۱۰ میکروگرم در لیتر موجود می‌باشد واین میزان در طی تخمیر افزایش می‌یابد (Leblance *et al*., 2010; Gangadharan *et al*., 2010). باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس از جمله باکتری‌هایی است که توانایی تولید فولات و اسید فولیک را دارا می‌باشد، اما این باکتری همراه باکتری‌های پروبیوتیک به میزان بیشتری ویتامین مذکور در ماست را تولید می‌کنند (Crittenden *et al*., 2003). همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شد، میزان اسید فولیک تولید شده توسط ماست حاوی باکتری پروبیوتیک بومی گونه لاکتوباسیلوس کازیی y2b4, JQ41273501 بیش از میزان اسید فولیک در ماست معمولی می‌باشد ($p<۰/۰۵$). توانایی تولید مشتقات اسید فولیک و فولات توسط باکتری‌های مایه ماست و

Archive of SID

www.SID.ir

گونه‌های مختلف پروبیوتیک در برخی پژوهش‌های پیشین گزارش شده است، گرچه تعداد این پژوهش ها محدود است. در پژوهشی دیگر میزان تولید فولات تولید شده توسط باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس ۲۱۴ میکروگرم بر لیتر ودر باکتری لاکتوباسیلوس لاکتیس۲۹۱ میکروگرم در لیتر بوده است (Sybesma *et al*., 2003). Papastoyiannidis و همکاران در سال ۲۰۰۶ تولید اسید فولیک در ماست معمولی و ماست پروبیوتیک اندازه گیری کردند. در ماست پروبیوتیک از باکتری‌های ماست همراه با باکتری‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم استفاده شده بود، تولید میزان اسید فولیک بیشتری مشاهده شد. در پژوهش‌های مشابه دیگری که از گونه‌های متفاوت باکتری‌های پروبیوتیک در تولید ماست استفاده شده بود نتایج فوق تایید شد و مشخص گردید که باکتری‌های پروبیوتیک اثر افزاینده در تولید اسید فولیک و مشتقات آن دارا می‌باشند (Crittenden *et al*., 2003). هم چنین گزارش شده است که ماست تولید شده از شیر بز که در آن از باکتری‌های پروبیوتیک استفاده شده میزان فولات بیش از نمونه شاهد بوده است (Sana *et al*., 2005). با توجه به نمودار ۱ در طول مدت زمان ۱۴ روز نگهداری روند نزولی در بقای اسید فولیک مشاهده می‌شود ($p<۰/۰۵$). باکتری اسید لاکتیک در دمای چهار درجه سلسیوس از فعالیت کمتری نسبت به زمان تخمیر در تولید اسید فولیک دارا می‌باشند و مصرف نسبت به تولید افزایش می‌یابد. به طور کلی باکتری‌ها برای رشد خود نیازمند اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها می‌باشند (Lin & Young, 2000a). باکتری‌ها در حضور و عدم حضور اسید فولیک توانایی تولید فولات و اسید فولیک را دارا می‌باشند و این بسته به دارا بودن توالی ژنوم مورد نظر مسیر شیگیمات و یا تجزیه GTP برای تولید پیش‌سازها متفاوت است. در بین باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس به عنوان مصرف کننده اسید فولیک و مشتقات آن معرفی شده‌اند، در حالی که استرپتوکوکوس ترموفیلوس از تولید کنندگان اسید فولیک می‌باشد (Lin & Young, 2000; Sybesma *et al*., 2003). نمودار ۷ میانگین تغییرات باکتری در مدت زمان چهارده روز نگهداری نشان داده است. از روز اول تا هفتم سرعت رشد باکتری افزایش یافته سپس از روز هفتم تا چهاردهم به دلیل کاهش میزان مواد مغذی در محیط کاهش یافته است. در مرحله توقف رشد یا همان فاز ثابت، تعداد سلول‌های میکروبی ثابت می‌ماند و این به دلیل کاهش مواد مغذی و تجمع متابولیت های میکروبی مانند اسید لاکتیک است. همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است میزان اسید فولیک در ماست معمولی و ماست پروبیوتیک از روز اول تا روز چهاردهم روند نزولی داشته است. با توجه به نمودار ۷ با کاهش جمعیت باکتری احتمالا میزان اسید فولیک موجود در ماست کاهش یافته است. از دلایل افزایش میزان اسید فولیک و فولات در ماست می تواند حضور باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی باشد، زیرا طبق تحقیق پژوهشگران محدودیت رشد باکتری لاکتوباسیلوس دلبروگی زیر گونه بولگاریکوس در حضور باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی گزارش شده است، که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (Korbekandi *et al*., 2009).

- تغییرات اسیدیته و pH

در تغییرات اسیدیته و pH همبستگی معنی‌دار و معکوس وجود دارد که ناشی از متابولیسم لاکتوز و تولید اسید لاکتیک می‌باشد ($P>۰/۰۵$). طبعا افزایش اسیدیته همراه با کاهش pH می‌باشد. روند افزایش اسیدیته و کاهش pH حاصل از نتایج بدست آمده در این تحقیق با یافته‌های پژوهش‌های پیشین مطابقت دارد (Papastoyiannidis *et al*., 2006; Zamberlin *et al*., 2011; Bano *et al*., 2011). با توجه به نمودار ۳، ماست حاصل از شیر گوسفند بالاترین اسیدیته را دارا می‌باشد، زیرا ترکیبات شیر گوسفند با شیر گاو و شیر بز متفاوت است و شیر بز و شیر گاو از نظر ترکیبات نسبتا شبیه یکدیگر می‌باشند (Bano *et al*., 2011). در بررسی‌های مختلف روند سرعت تولید اسید لاکتیک و سایر متابولیت‌ها و کند شدن این روند با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (Abdel *et al*., 2011).

- ارزیابی حسی

با توجه به نتایج ارائه شده (نمودار ۵) تفاوت معنی‌دار بین ماست معمولی و ماست پروبیوتیک مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). علت این امر را می‌توان به معنی‌دار نبودن تغییرات pH و اسیدیته در ماست معمولی و ماست

Archive of SID
www.SID.ir

پروبیوتیک نسبت داد که ایجاد خواص نامطلوب در طعم و بافت آن ایجاد نشده است. طی پژوهشی با استفاده از باکتری‌های جداسازی شده از ماست‌های سنتی و تلقیح به همراه استارتر تجاری هیچ گونه تغییر قابل ملاحظه‌ای در pH و اسیدیته مشاهده نشد (خمیری و همکاران، ۱۳۸۸). با توجه به نمودار ۵ در بین ماست حاصل از شیر گاو و ماست حاصل از شیر گوسفند و ماست حاصل از شیر بز تفاوت معنی‌دار مشاهده شده است ($P<۰/۰۵$). ماست حاصل از شیر بز از نظر بافت نسبت به ماست حاصل از شیر گوسفند و شیر گاو از مقبولیت کمتری برخوردار بوده است و احتمالا به دلیل پائین بودن ظرفیت کازئین هم چنین تناسب آلفا کازئین و اندازه‌های میسل‌های کازئین دارای بافت ضعیف و سست می‌باشد (Park *et al*., 2007). هم چنین شیر بز مقدار ازت غیر پروتئینی بالاتری نسبت به این بخش از ترکیبات ازته در مقایسه با شیر گوسفند و شیر گاو دارد که می تواند دلیل دیگری برای بافت ضعیف باشد در حالی که در شیر گوسفند بافت خوبی ایجاد می‌شود (Gou *et al*., 2003).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش مشخص شد ماست پروبیوتیک حاصل از باکتری جداسازی شده از محصولات تخمیری توانایی تولید اسید فولیک دارد. به طور میانگین مصرف میزان ۱۰۰ گرم از ماست حاصل از شیر گاو حاوی باکتری مایه ماست و باکتری پروبیوتیک (ماست پروبیوتیک) در بین روزهای اول تا هفتم توانایی تامین بیش از ثلث نیاز یک فرد از نظر این اسید را دارا است. مناسب‌ترین زمان مصرف ماست براساس یافته‌های این پژوهش و کارهای مشابه هفته اول پس از تولید می‌باشد. مصرف سرانه ماست در کشور که حدود ۴۰ درصد می‌باشد و کمبود تنوع در محصولات پروبیوتیک کشور با توجه به اثرات سلامتی بخش باکتری‌های پروبیوتیک بر بدن، نتایج حاصل از این پژوهش راهکار مناسبی جهت افزایش تنوع و افزایش مصرف این محصولات می‌باشد. از جهتی استفاده از باکتری پروبیوتیک بومی در صنعت صرفه اقتصادی داشته و راهبردی به سوی تولید استارترهای پروبیوتیک مورد نیاز کشور می‌باشد. علاوه بر آن و مهم‌ترین آن ها کاهش بیماری‌های ناشی از کمبود اسید فولیک، از جمله بیماری کم خونی و نقص لوله عصبی در نوزادان (بسته شدن ناقص طناب وستون نخاعی می‌باشد) می‌باشد، که سالانه در کشور تعداد زیادی از نوزادان در اثر این بیماری قبل و بعد از تولد جان خود را از دست می‌دهند.

سپاسگزاری

از مسئولان و کارکنان محترم آزمایشگاه رازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، برای همکاری در این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع

بی‌نام. (۱۳۸۷). موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ماست پروبیوتیک، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. تجدید نظراول. شماره ۱۱۳۲.

بی‌نام. (۱۳۷۹). موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. آزمون اندازه‌گیری اسیدیته کل قابل عیارسنجی. شماره ۵۲۲۲.

خمیری، م.، مرتضوی، س.، قدوسی، ح.، خامسان، ع. و احمد، د. (۱۳۸۸). تولید ماست بیفیدوس با استفاده از ایزوله ایرانی و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی آن. ۵: ۹۵-۱۰۵.

Abdel Moneim, E. S., Rania, M. A. & Zakaria, A. S. (2011). Effects of Storage on Quality of Yoghurt Prepared from Cows' and Goat's Milk and Pure Strains of Lactic Acid Bacteria. 12(1): 136-143.

Brinques, G. B. & Ayub, M. A. Z. (2011). Effect of microencapsulation on survival of Lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of food engineering*. 103(2): 123-128.

Bano, P., Abdullah, M., Nadeem, M., Babar, M. E. & Khan, G. A. (2011). Preparation of functional yoghurt from sheep and goat milk blends. *Pak. J. Agri. Sci*. *48*(3): 211-215.

Crittenden, R. G., Martinez, N. R. & Playne, M. J. (2003). Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *Int. J. Food Microbiol*. 80: 217–222.

Dana, M. G., Salmanian, A. H., Yakhchali, B. & Jazi, F. R. (2010). High folate production by naturally occurring Lactobacillus sp. with

Archive of SID

www.SID.ir

probiotics potential isolated from dairy products in Ilam and Lorestan provinces of Iran. *African Journal of Biotechnology*. *9*(33): 5383-5391.

FAO/WHO. (2001). Folate and folic acid. In HumanVitamin and Mineral Requirements: *Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Bangkok, Thailand*; FAO: Rome, Italy; Chapter 4: 53–63.

Gangadharan, D., *Sivaramakrishnan*, S., Pandey, A. & Madhavan, N. (2010). Folate-producing lactic acid bacteria from cow's milk with probiotic characteristics. International Journal of Dairy Technology, 63(3): 339

Guo, M. (2003). Goat's milk. In: Caballero, B., Trugo L.,Finglas,P.(Eds.),Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Academic Press, London, UK, pp. 2944–2949.

Hugenholtz, J. & Smid, E. J. (2002). Nutraceutical production with food-grade microorganisms. Curr Opin Biotechnol. 13:497–507.

Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT-Food Science and Technology, 39(10): 1221-1227.

Korbekandi, H., Jahadi, M., Maracy, M., Abedi, D. & Jalali, M. (2009). Production and evaluation of a probiotic yogurt using Lactobacillus casei ssp. casei. *International Journal of Dairy Technology*. 62(1): 75-79.

LeBlanc, J. G., Savoy de Giori, G., Smid, E. J., Hugenholtz, J. & Sesma, F. (2002). Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms. In*Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 329-339.

LeBlanc, J. G., Taranto, M. P., Molina, V. & Sesma, F. (2010b). B-group vitamins production by probiotic lactic acidbacteria. In Biotechnolog of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications ed. Mozzi, F., Raya, R. and Vignolo, G. 211–232. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell.

Lin, M. Y. & Young, C. M. (2000). Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 10: 409–413.

Maragkoudakis, P. A., Miaris, C., Rojez, P. & Manalis, N. (2006). Production of traditional Greek yoghurt using Lactobacillus strains with probiotic potential as starter adjuncts. *International Dairy Journal*. 1: 52–60.

Park Y. W., Juarez, M., Ramos, M. & Haenlein, G. F. W. (2007). PHysico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68: 88-113.

Papastoyiannidis, G., Polychroniadou, A., Michaelidou, A. M. & Alichanidis, E. (2006). Fermented milks fortified with B-group vitamins: vitamin stability and effect on resulting products. *Food Sci Technol Int* .12: 521–529.

Rossi, M., Amaretti, A. & Raimondi, S. (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 3: 118–134.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 84: 197-215.

Sanna, M. G., Mangia, N. P., Garau, G., Murgia, M. A., Massa, T., Franco, A. & Deiana, P. (2005). Selection of folate production lactic acid bacteria for improving fermented goat milk. Italian journal of food science, 17(2).

Santos, F., Wegkamp, A., de Vos, W. M., Smid, E. J. & Hugenholtzm, J. (2008). High-Level folate production in fermented foods by the B12 producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3291–3294.

Sarkar, S. (2008). Effect of probiotics on biotechnological characteristics of yoghurt: a review. British food journal, 110(7), 717-740.

Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M. H. & Hugenholtz, J. (2003). Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4542–4548.

Tamime, A. Y. & Robinson, A. (1999). Yogurt: Science and technology. *Oxford: Pergamon Press*.

Wouters, J. A., Kamphuis, H., Hugenholtz, J., Kuipers, O. P., William, D. V. & Abee, T. (2002). Changes in glycolytic activity of Lactococcus lactis induced by low temperature.Applied and environmental microbiology. 9: 3686-3691.

Zamberlin, Š., Mioč, B. & Samaržija, D. (2011). Influence of yoghurt cultures on some chemical parameters of sheep's milk yoghurt during storage. In *Proceedings. 46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture. Opatija. Croatia*. 908- 911.

Zanjani, M. A. K., Tarzi, B. G., Sharifan,

Archive of SID

www.SID.ir

A., Mohammadi, N., Bakhoda, H. & Madanipour, M. M. (2012). Microencapsulation of Lactobacillus casei with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream filled cake. African Journal of Microbiology Research, 6(26), 5511-5517.

Archive of SID

www.SID.ir