Iranian Food Science and Technology Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 22, No. 6, Jan.-Feb. 2027, p. 621-641

Folate Biofortification in Wheat Sourdough Bread Using Folate-producing Lactic Acid Bacteria and Yeast: a Combined Laboratory and Chemometric Approach

S. Afzali[1], M.R. Edalatian Dovom[1]*, M.B. Habibi Najafi[1], A. Moghimi[2], A. Pourfarzad[3]

1- Department of Food Science and Technology, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: edalatian@um.ac.ir)
2- Rayan Research Center for Neuroscience and Behavior, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad
3- Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

Received: 19.05.2026
Revised: 24.08.2026
Accepted: 02.09.2026
Available Online: 08.09.2026

How to cite this article:
Afzali, S., Edalatian Dovom, M.R., Habibi Najafi, M.B., Moghimi, A., & Pourfarzad, A. (2027). Folate biofortification in wheat sourdough bread using folate-producing lactic acid bacteria and yeast: a combined laboratory and chemometric approach. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *22*(6), 621-641. (In Persian). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2026.98787.1579

Introduction

Fermentation is one of the oldest biological technologies used in food production and has played an important role in the processing of grain-based foods for thousands of years. Among them, sourdough technology, as one of the most basic and yet most important biological methods for bread production, has been used in many countries around the world. Systematic and modern studies in the field of sourdough biotechnology have expanded significantly since the 1990s and initially focused mainly on improving the sensory properties, texture, volume and shelf life of bread. However, in recent years, researchers have paid increasing attention to the role of sourdough in improving the functional and nutritional properties of grain products. Studies have shown that sourdough fermentation can improve the digestibility, bioavailability of nutrient components, and nutritional value of bakery products through metabolic and enzymatic changes. During sourdough fermentation, LABs and yeasts engage in various interactions that include nutrient competition, mutualistic relationships, acidity regulation, flavor formation, and nutrient utilization. Folate, as one of the essential micronutrients in the metabolism of living cells, is a derivative of folic acid and a B-vitamin. Folic acid is a form of folate that is commonly used in fortified foods and supplements. The low concentration of folate in biological materials and the presence of different chemical structural forms with different stabilities have created challenges for the analysis of folate levels in foods. An alternative approach, currently practiced in many countries, is the mandatory fortification of staple foods with folic acid. However, the benefits and risks of folic acid supplementation remain widely debated. In this study, folate-producing lactic acid bacteria were investigated as an adjunct culture in wheat sourdough for the production of functional bread containing folate.

Materials and Methods

From a total of 43 strains of lactic acid bacteria isolated from Khorasan traditional dairy products, which had previously been screened for extracellular folate production, 3 strains were selected based on the highest folate production using NCSS software. To prepare sourdough, first the lactic acid bacteria strains were incubated in MRS Broth medium at 37°C for 24 hours until 10^8 cfu/g (corresponding to the McFarland standard) was produced. Then the biomass produced was centrifuged and suspended in 10 ml of saline buffer. The microbial suspension was stirred until the number of bacteria was about 3-5×10^8 cfu/100g per 100 g of dough for sourdough. After

Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/ifstrj.2026.98787.1579

covering the dough with aluminum foil, the dough was incubated at 30°C for 20 hours. Four types of sourdough S1 (sourdough prepared from flour, water, yeast, and selected lactic acid bacteria), S2 (sourdough prepared from flour, water, and selected lactic acid bacteria), S3(sourdough prepared from flour, water, yeast) and S4(sourdough prepared from flour, water) The titratable acidity of sourdough was calculated in terms of milliliters of soda consumed. Four types of bread B1 (bread prepared from sourdough S1), B2 (bread prepared from sourdough S2), B3 (bread prepared from sourdough S3), and B4 (bread prepared from sourdough S4) were prepared with different aforementioned formula, t. The amount of folate produced was determined by HPLC, Chromatographic analyses were performed on an analytical HPLC system (1260 HPLC system Infinity II LC), Phenomenex Luna C18 column (particle size 5 µm, pore size 100 angstroms, 250 × 4.6 mm), with a flow rate of 0.30 mL/min. For comprehensive data analysis, in addition to classical statistical tests, principal component analysis (PCA) and partial least squares regression (PLSR) were also used to investigate multivariate relationships between physicochemical parameters and folate levels.

Results and Discussion

The results showed that the highest folate levels were observed in sourdough S1 (14.04 µg/100 g) and bread B1 (13.32 µg/100 g), while the lowest levels were observed in control samples S4 and B4.The overall trend of the results showed that the simultaneous presence of yeast and selected lactic acid bacteria increased folate production during fermentation and improved folate levels in the final product, although some of the folate was reduced during the baking stage. PCA results showed that the variables related to acidity, pH, and folate were strongly correlated, and the two principal components explained more than 94% of the variance in the data. PLSR also showed that both the final fermentation characteristics and the intensity of metabolic changes during fermentation were able to predict the final folate content of bread, with the difference that the model based on dynamic changes provided higher predictive power. Overall, the findings showed that using mixed cultures of yeast and folate-producing lactic acid bacteria considered as an effective strategy for the production of functional breads enriched with folate, and chemometric analyses play an important role in understanding the complex behavior of this fermentation system.

Keywords: Folate, Functional bread, PCA, PLSR, Sourdough

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۲۲، شماره ٦، بهمن–اسفند ١٤٠٥، ص. ٦٤١–٦٢١

غنی‌سازی زیستی فولات در نان خمیرترش گندم با استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده فولات و مخمر: رویکرد ترکیبی آزمایشگاهی و کمومتریک

سعید افضلی [۱]– محمدرضا عدالتیان دوم [۱*]– محمدباقر حبیبی نجفی [۱]– علی مقیمی [۲]– امیر پورفرزاد [۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۱۱

چکیده

امکان استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک مولد فولات به‌عنوان کشت الحاقی در خمیرترش گندم و تأثیر فرمولاسیون‌های مختلف خمیرترش بر میزان فولات قابل اندازه‌گیری در نان گندم بررسی شد. از میان ۴۳ سویه جداشده از فرآورده‌های لبنی سنتی خراسان، سه سویه با بیشترین تولید فولات خارج‌سلولی انتخاب شدند. چهار تیمار خمیرترش شامل S1 (آرد، آب، مخمر و LAB منتخب)، S2 (آرد، آب و LAB منتخب) S3 (آرد، آب و مخمر) و S4 (شاهد؛ آرد و آب) تهیه و نان‌های متناظر (B1–B4) تولید شدند. میزان فولات در خمیرترش و نان با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شدند. pH و اسیدیته نمونه‌ها و تغییرات pH و اسیدیته حین تخمیر اندازه‌گیری شدند. تغییرات میزان فولات حین فرآیند نان بررسی شد و درصد افت فولات مشخص گردید. علاوه بر آزمون‌های آماری کلاسیک، از تحلیل مؤلفه‌های اصلی و رگرسیون حداقل مربعات جزئی، به‌عنوان ابزارهای اکتشافی چندمتغیره برای بررسی الگوهای تغییرات در داده‌ها به کار گرفته شدند. نتایج نشان داد بیشترین میزان فولات در خمیرترش S1 (۱۴/۰۴ µg/100 g) و نان B1 (۱۳/۳۲ µg/100 g) تهیه شده با خمیر ترش حاوی مخمر و LAB منتخب مشاهده شد، و کمترین مقدار مربوط به S4 بود. حضور همزمان مخمر و LAB موجب افزایش تولید فولات طی تخمیر و بهبود سطح فولات نهایی نان شد. نتایج PCA نشان داد که دو مؤلفه اصلی بیش از ۹۴٪ از واریانس داده‌ها را تبیین کردند و الگوی تغییرات مرتبط با pH، اسیدیته و فولات را در نمونه‌ها توصیف نمودند. دو رویکرد PLSR بر اساس ویژگی‌های نهایی تخمیر و تغییرات دینامیکی طی تخمیر بررسی شدند. مدل مبتنی بر تغییرات دینامیکی برازش بیشتری نسبت به مدل مبتنی بر ویژگی‌های نهایی نشان داد؛ با این حال، به‌دلیل محدودیت تعداد نمونه‌ها و نبود اعتبارسنجی مستقل، نتایج PLSR صرفاً در سطح اکتشافی قابل تفسیر بوده و برای توسعه مدل‌های پیش‌بینی معتبر به مطالعات تکمیلی نیاز است.

واژه‌های کلیدی: تحلیل مؤلفه‌های اصلی، تخمیر، رگرسیون حداقل مربعات جزئی، زیست‌فناوری غذایی، کشت الحاقی

مقدمه

تخمیر یکی از قدیمی‌ترین فناوری‌های زیستی مورد استفاده در تولید مواد غذایی بوده و برای هزاران سال نقش مهمی در فرآوری غذاهای مبتنی بر غلات ایفا کرده است. در این میان، فناوری خمیرترش به‌عنوان یکی از ابتدایی‌ترین و در عین حال مهم‌ترین روش‌های زیستی تولید نان، در بسیاری از کشورهای جهان مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات سیستماتیک و مدرن در زمینه بیوتکنولوژی خمیرترش از دهه ۱۹۹۰ گسترش قابل توجهی یافته و در ابتدا عمدتاً بر بهبود ویژگی‌های حسی، طعم، بافت، حجم و ماندگاری نان متمرکز بوده است. با این حال، در سال‌های اخیر توجه پژوهشگران به نقش خمیرترش در بهبود ویژگی‌های عملکردی و تغذیه‌ای فرآورده‌های غلات افزایش یافته

۱– گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*– نویسنده مسئول: (Email: edalatian@um.ac.ir
۲– هسته پژوهشی علوم اعصاب و رفتار رایان، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳– گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
https://doi.org/10.22067/ifstrj.2026.98787.1579

است. مطالعات نشان داده‌اند که تخمیر خمیرترش می‌تواند از طریق تغییرات متابولیکی و آنزیمی، قابلیت هضم، دسترسی زیستی ترکیبات مغذی و ارزش تغذیه‌ای محصولات نانوایی را بهبود بخشد (Wang & Wang, 2024).

خمیرترش مخلوطی از آرد و آب است که در اثر فعالیت متقابل مخمرها و باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)[1] تحت فرآیند تخمیر قرار می‌گیرد و محیطی پیچیده از برهم‌کنش‌های میکروبی و متابولیکی را ایجاد می‌کند (Clarke & Arendt, 2005). نسبت مخمرها به باکتری‌های اسید لاکتیک در خمیرترش معمولاً حدود ۱ به ۱۰۰ گزارش شده است. در این سیستم، باکتری‌های اسید لاکتیک از طریق تولید اسیدهای آلی موجب اسیدی شدن محیط، کاهش pH و ایجاد شرایط مناسب برای توسعه ویژگی‌های تکنولوژیکی و تغذیه‌ای نان می‌شوند، در حالی‌که مخمرها عمدتاً مسئول تولید گاز و افزایش حجم خمیر هستند (Banu, Vasilean, & Aprodu, 2011). تخمیر خمیرترش علاوه بر بهبود ساختار و ویژگی‌های حسی نان، موجب افزایش ظرفیت نگهداری آب، کاهش سرعت بیات شدن، مهار فعالیت آنزیم‌های نامطلوب و افزایش ماندگاری محصول نیز می‌شود (Wagner, 2005). به همین دلیل، خمیرترش به‌عنوان یک سامانه زیستی پیچیده و یک افزودنی طبیعی که به‌طور کلی به‌عنوان ایمن شناخته می شود[2]، در صنایع نانوایی مورد توجه قرار گرفته است (Katina, 2005).

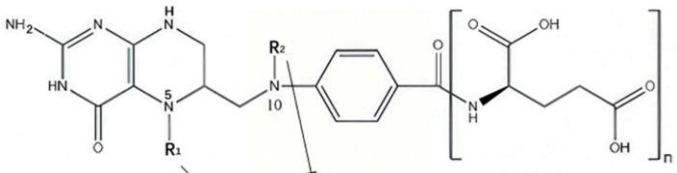
در سال‌های اخیر، استفاده از خمیرترش به‌منظور غنی‌سازی زیستی مواد غذایی با ریزمغذی‌ها، به‌ویژه ویتامین‌های گروه B، مورد توجه گسترده قرار گرفته است. در این میان، فولات (ویتامین B9) یکی از مهم‌ترین ریزمغذی‌های ضروری برای متابولیسم سلولی، سنتز DNA، تقسیم سلولی، متیلاسیون و بیوسنتز نوکلئوتیدها محسوب می‌شود (Hanson, Gage, & Shachar-Hill, 2000). فولات در پیشگیری از ناهنجاری‌های لوله عصبی، برخی سرطان‌ها و اختلالات متابولیکی نقش اساسی دارد و کمبود آن یکی از مشکلات تغذیه‌ای رایج در بسیاری از جوامع محسوب می‌شود (Wald, Sneddon, Densem, Frost, & Stone, 1991). فولات طبیعی موجود در مواد غذایی عمدتاً به‌صورت مشتقات تتراهیدروفولات[3] (THF) وجود دارد، در حالی‌که اسید فولیک شکل سنتزی و اکسیدشده این ویتامین است که به‌طور گسترده در مکمل‌ها و برنامه‌های غنی‌سازی غذایی استفاده می‌شود (Lamers, Prinz-Langenohl, Brämswig, & Pietrzik, 2006; Wald *et al.*, 1991).

اگرچه غنی‌سازی اجباری مواد غذایی با اسید فولیک در بسیاری از کشورها اجرا شده است، اما نگرانی‌هایی در خصوص مصرف بیش از حد اسید فولیک سنتزی و اثرات جانبی احتمالی آن، از جمله پوشاندن علائم کمبود ویتامین B12، مطرح شده است. در مقابل، فولات طبیعی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها می‌تواند جایگزینی ایمن‌تر و زیست فراهم‌تر برای اسید فولیک سنتزی باشد (Laiño, del Valle, de Giori, & LeBlanc, 2013). به همین دلیل، استفاده از میکروارگانیسم‌های تولیدکننده فولات به‌منظور غنی‌سازی زیستی مواد غذایی، به‌ویژه در فرآورده‌های تخمیری، مورد توجه روزافزون قرار گرفته است.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها قادر به سنتز فولات هستند، در حالی‌که برخی سویه‌ها ممکن است فولات را مصرف کنند. میزان تولید یا مصرف فولات به نوع سویه، شرایط تخمیر، ترکیب محیط و برهم‌کنش میان میکروارگانیسم‌ها وابسته است. گزارش شده است که برخی سویه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* توانایی تولید فولات را دارند، اگرچه رفتار سویه‌ها در شرایط مختلف ممکن است متفاوت باشد. همچنین، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که برهم‌کنش همزیستی میان مخمرها و باکتری‌های اسید لاکتیک می‌تواند شدت فعالیت متابولیکی و تولید ترکیبات زیست‌فعال از جمله فولات را افزایش دهد (Crittenden, Martinez, & Playne, 2003; Rao, Reddy, Pulusani, & Cornwell, 1984).

فولات از نظر شیمیایی شامل یک حلقه پتریدین متصل به پارا-آمینوبنزوات (pABA) و یک زنجیره پلی‌گلوتامیل است که بسته به درجه اکسیداسیون و نوع گروه‌های متصل به موقعیت‌های N5 و N10 می‌تواند اشکال مختلفی از جمله دی‌هیدروفولات[4] (DHF)، تتراهیدروفولات (THF) و ۵-متیل تتراهیدروفولات[5] (5-MTHF) را تشکیل دهد (Li *et al.*, 2025; Saini, Nile, & Keum, 2016) (شکل ۱). تفاوت در ساختار شیمیایی مشتقات فولات می‌تواند بر پایداری، فعالیت زیستی و دسترسی زیستی آن‌ها تأثیرگذار باشد. علاوه بر این، فولات موجود در مواد غذایی معمولاً در ماتریکس‌های پیچیده غذایی محصور است و فرآیندهایی نظیر تخمیر و عملیات حرارتی می‌توانند از طریق تغییر ساختار ماتریکس غذایی، موجب آزادسازی و افزایش دسترسی زیستی فولات شوند (Liu, Kariluoto, Edelmann, & Piironen, 2021).

1- Lactic Acid Bacteria
2- Generally Recognized As Safe (GRAS)
3- Tetrahydrofolate (THF)
4- Dihydrofolate
5- 5-methyl Tetrahydrofolate



R_1	R_2	Folate vitamer name
/	H	Folic acid
H	H	THF
CH_3	H	5-methylTHF
CHO	H	5-formylTHF
CH=NH	H	5-formiminoTHF
H	CHO	10-formylTHF
$-CH_2-$		5,10-methyleneTHF
=CH-		5,10-methenylTHF

(B)

شکل ۱- ساختار شیمیایی فولات‌ها R1 و R2 نشان‌دهنده دو گروه عاملی فولات‌ها هستند

گروه‌های عاملی خاص متصل به مولکول فولات، نام‌های ویتامین فولات آن را تعریف می‌کنند.

Fig. 1. The chemical structure of folates R1 and R2 represent the two functional groups of folates

The specific functional groups attached to the folate molecule define its vitamin folate names (Li, Duan, Ramaswamy, & Wang, 2025)

با وجود مطالعات متعدد در زمینه تولید فولات توسط میکروارگانیسم‌ها، اطلاعات محدودی درباره اثر همزمان مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب بر تغییرات فیزیکوشیمیایی خمیرترش، شدت فرآیند تخمیر و غنی‌سازی زیستی فولات در نان وجود دارد. علاوه بر این، بیشتر مطالعات پیشین عمدتاً بر تحلیل‌های تک‌متغیره متمرکز بوده‌اند و روابط پیچیده میان پارامترهایی نظیر pH، اسیدیته، تغییرات متابولیکی طی تخمیر و میزان فولات نهایی محصول به‌صورت جامع مورد ارزیابی قرار نگرفته است. از آنجاکه تخمیر خمیرترش یک سیستم بیولوژیکی پیچیده و چندمتغیره محسوب می‌شود، استفاده از روش‌های کمومتریک و تحلیل‌های چندمتغیره می‌تواند در درک بهتر برهم‌کنش میان متغیرهای فیزیکوشیمیایی و تغذیه‌ای مؤثر باشد.

در این راستا، تحلیل مؤلفه‌های اصلی[1] (PCA) به‌منظور شناسایی الگوهای پنهان، کاهش الگوهای واریانس و تفکیک رفتار تیمارهای مختلف خمیرترش مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، رگرسیون حداقل مربعات جزئی[2] (PLSR) برای مدل‌سازی و پیش‌بینی میزان فولات نهایی نان بر اساس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خمیرترش و شدت تغییرات متابولیکی طی فرآیند تخمیر به کار گرفته شد. بنابراین، هدف از انجام این پژوهش، تولید نان غنی‌شده زیستی با فولات با استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک سنتزکننده فولات در سیستم خمیرترش، بررسی تغییرات فیزیکوشیمیایی و متابولیکی طی فرآیند تخمیر، و تحلیل روابط میان پارامترهای تخمیر و میزان فولات نهایی نان با استفاده از روش‌های کمومتریک چندمتغیره بود.

مواد و روش‌ها

مواد خام، آرد ۱۳ درصد سبوس گرفته شده (آرد با درصد استخراج ۸۷) از کارخانه آرد جام حصار شهرستان تربت جام تهیه شد. رطوبت این آرد ۱۳/۵ درصد، پروتئین ۱۲/۷ درصد، خاکستر ۱/۱۸ درصد، گلوتن ۳۰ درصد و عدد فالینگ ۲۷۰ ثانیه می‌باشد. مخمر خشک فعال از شرکت ایران ملاس فریمان تهیه شد. ۵- متیل تتراهیدرو فولات (سیگما M0132) تهیه شد. سرم موش از گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد از چند رت تهیه شد. کلیه مراحل آزمایشی حیوانی بر اساس کدهای اخلاق بین‌المللی و ضوابط اخلاق مصوب کمیته اخلاق زیستی–پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد و با اخذ کد اخلاق مربوطه اجرا شد. مداخلات خونگیری با بیهوشی عمیق توسط کتامین زایلازین انجام شد و در انتهای آزمایشات نیز پس از نمونه‌گیری‌های لازم (تحت بیهوشی عمیق) حیوانات یوتانایز شد. اجساد مربوطه برای دفن و حذف به طریق بهداشتی تحویل دانشکده علوم شد

1- Principal component analysis

2- Partial least squares regression

(کد و شناسه اخلاق: IR.UM.REC.1404.030). از مجموع ۴۳ سویه باکتری اسید لاکتیک جدا شده (۱۲ سویه *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، ۱۵ سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*، ۱۳ سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *لاکتیس*، ۳ سویه *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*) از فرآورده‌های لبنی سنتی خراسان (ماست مناطق عشایری خراسان، کره مسکه و کشک محلی) که پیش از این غربالگری باکتری‌ها از نظر تولید فولات خارج سلولی به همراه ویژگی‌های تکنولوژیکی آنها توسط حسینی و همکاران (Hosseini, Habibi Najafi, & Edalatian Dovom, 2024) مورد بررسی قرار گرفته و ۳ سویه که بیشترین میزان تولید فولات خارج سلولی را داشتند، انتخاب شدند (جدول ۱).

جدول ۱- سه سویه منتخب باکتری‌های اسید لاکتیک

Table 1- Three selected strains of lactic acid bacteria

منبع و ماده غذایی Source and Food	کد Code	جنس و گونه Genus and Species
ماست مناطق عشایری خراسان، کره مسکه و کشک محلی Yogurt from the nomadic regions of Khorasan, Maskeh butter and Local Kishk	26	*لاکتو باسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
ماست مناطق عشایری خراسان، کره مسکه و کشک محلی Yogurt from the nomadic regions of Khorasan, Maskeh butter and Local Kishk	25	*لاکتو باسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
ماست مناطق عشایری خراسان، کره مسکه و کشک محلی Yogurt from the nomadic regions of Khorasan, Maskeh butter and Local Kishk	K73	*استرپتوکوکوس ترموفیلوس* *Streptococcus thermophilus*

تهیه خمیر ترش با استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده به‌عنوان کمک آغازگر

برای تهیه خمیر ترش ابتدا سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک در محیط MRS Broth به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C تا ایجاد 10^8 CFU/g[1] (بر اساس روش مک فارلند) داخل گرمخانه قرار گرفت. سپس زیست‌توده تولیدی توسط سانتریفیوژ (۵۰۰۰×g در ۴ °C به‌مدت ۱۵ دقیقه) از محیط‌کشت جدا شده و در ۱۰ میلی‌لیتر بافر نمکی رینگر معلق شد. سوسپانسیون میکروبی به گونه‌ای به مخلوط آرد و آب اضافه می‌شود تا تعداد آن حدود $3\text{-}5\times10^8$ CFU/100g باکتری در هر ۱۰۰ گرم خمیر برای خمیر ترش به‌دست آید. پس از پوشاندن خمیر با فویل آلومینیومی، خمیر به‌مدت ۲۰ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۰ °C قرار داده می‌شود. چهار نمونه خمیر ترش تهیه شد ۱.- نمونه خمیر ترش تهیه شده با آرد، آب، مخمر و اضافه کردن مخلوط سویه‌های باکتری اسید لاکتیک (S1) ۲- خمیر ترش تهیه شده از آرد، آب و مخلوط باکتری‌های اسید لاکتیک (S2) ۳- خمیر ترش تهیه شده از آرد، آب و مخمر (S3) ۴- خمیر ترش مخلوط آرد و آب (S4) به‌عنوان نمونه کنترل یا شاهد تهیه شد (Banu *et al*., 2011).

تعیین pH و اسیدیته قابل تیتر خمیر ترش

برای این منظور معادل ۱۰ گرم از خمیر ترش با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر، مخلوط شده و محلول مذکور با سود ۰/۱ نرمال تیتر شد. اسیدیته بر حسب میلی‌اکی والان در ۱۰۰ گرم یا درجه اسیدیته محاسبه گردید. pH با pH متر دیجیتالی که از قبل کالیبره گردیده بود اندازه‌گیری شد (Katina, 2005).

تهیه نان با استفاده از خمیر ترش‌های تولیدی

چهار نوع نان با استفاده از خمیرترش‌های مختلف پخته شد: ۱- نان تهیه شده از تخمیر خمیر ترش با مخمر نانوایی *ساکارومایسس سرویزیه* و باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب (B1)، ۲- نان تهیه شده از خمیر ترش باکتری‌های اسید لاکتیک بدون اضافه کردن مخمر (B2)، ۳- نان تهیه شده با خمیر ترش مخمر (B3)، ۴- نان تهیه شده با خمیر ترش شاهد (B4) (آرد و آب). فرمولاسیون تهیه نان: نمونه‌های خمیر در دمای ۲۸ °C با مخلوط کردن ۸۶۶ گرم آرد، ۴۰۰ گرم خمیر ترش، ۲۸۴ میلی‌لیتر آب، ۲۰ گرم نمک طعام و ۱۵ گرم مخمر فشرده در آزمایشگاه تهیه شد. سپس خمیر به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ °C (RH =۱۰۰٪) تا زمانی‌که خمیر به سفتی مناسب برسد. تکه‌های خمیر (۴۵۰ گرم) با دست قالب‌گیری شد، و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ °C قرار داده شد. نان‌های تافتون در دمای ۲۰۰ °C به‌مدت ۶۰

1- Colony Forming Unit

دقیقه پخته شدند. شرایط پخت و مراحل پخت همه نان‌ها مشابه هم بود (Kariluoto *et al*., 2004; Banu *et al*., 2011).

استخراج ۵- متیل تتراهیدروفولات [1] (5-MTHF) و دگلوتامیلاسیون

نمونه‌های خمیرترش و نان با استفاده از استخراج و تیمار دو آنزیمی تهیه شد. ابتدا نمونه‌ها توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردید و پس از خرد شدن توسط آسیاب، به‌وسیله الک مش ۴۰ غربال شد. سپس، ۱۰۰ میلی‌گرم پودر به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد و ۱ میلی‌لیتر محلول استخراج تازه تهیه شده (بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار، pH:۷، ۱٪ آسکوربات سدیم و ۰/۲ ٪ بتا-مرکاپتواتانول) اضافه شد. پس از همگن‌سازی، مخلوط بلافاصله به‌مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوشانده شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه روی یخ خنک شد. پس، ۵۰ میکرولیتر محلول آلفا-آمیلاز (سیگما A9857) (۲۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) اضافه شد و مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه شد تا نشاسته به‌طور کامل به منوساکارید و دی‌ساکاریدها تجزیه شود. مخلوط به‌مدت ۳ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد، سپس به‌مدت ۵ دقیقه روی یخ خنک شد و به‌دنبال آن ۳۵ میکرولیتر سرم موش (گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد) اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه شد تا دنباله‌های پلی‌گلوتامیله شده دکونژوگه شوند. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۳ دقیقه جوشانده شدند، به‌مدت ۱۰ دقیقه روی یخ خنک شدند و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. محلول‌های رویی برای پاکسازی به لوله‌های اولترافیلتراسیون ۳ کیلودالتونی (Millipore, Billerica, MA, USA) منتقل و به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰rpm در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. در نهایت، محلول فیلتر شده حاصل جمع‌آوری و ۱۰۰ میکرولیتر از آن برای تشخیص مستقیم فولات به لوله‌های جدید منتقل شد و محلول باقیمانده در دمای ۸۰- °C نگهداری شد (Riaz *et al*., 2019; Zheng *et al*., 2022).

اندازه‌گیری میزان 5-MTHF با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) [2]

آنالیزهای کروماتوگرافی بر روی سیستم HPLC تحلیلی (1260 Infinity II LC HPLC system)، ستون Phenomenex Luna C18 (اندازه ذرات ۵ میکرومتر، اندازه منافذ ۱۰۰ آنگستروم، ۴/۶ × ۲۵۰ میلی‌متر)، با سرعت جریان ۰/۳ میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد. نمونه تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود. دمای انژکتور و ستون به‌ترتیب در ۴ و ۲۵ °C نگه داشته شد. تشخیص با استفاده از یک آشکارساز UV تنظیم شده در ۲۸۰ نانومتر انجام شد. فازهای متحرک شامل ۰/۱ ٪ (حجمی/حجمی) اسید فرمیک در آب (فاز A) و ۰/۱٪ (حجمی/حجمی) اسید فرمیک در استونیتریل (فاز B) بودند. برنامه گرادیان به‌مدت ۸ دقیقه و ۱۲ ثانیه اجرا شد. نسبت فاز متحرک B به‌صورت خطی از ۵ به ۹ درصد در طول ۲ دقیقه افزایش یافت. در ۶ دقیقه بعدی، نسبت فاز B به ۹/۶ درصد افزایش یافت و سپس در ۱۲ ثانیه به ۵ درصد کاهش یافت و پس از آن تعادل برقرار شد. Lin 6308 (۵-متیل تتراهیدروفولات) به‌عنوان کنترل استانداردسازی استفاده شد و با هر ۲۰ نمونه یک بار تکرار شد. فرآیند متوقف شد و بررسی شد تا مشخص شود که آیا تفاوت در محتوای فولات بین دو تکرار از ۵ درصد بیشتر است یا خیر. استاندارد مشتق فولات رقیق (۵-متیل تتراهیدروفولات) شد و برای تنظیم شرایط آنالیز و تعیین زمان ماند استفاده شدند. مشتقات با زمان بازداری شناسایی و با استفاده از یک خط رگرسیون منحنی کالیبراسیون پنج نقطه‌ای که با استانداردهای خارجی تولید شده بود، تعیین مقدار شدند. استاندارد خارجی ۵-متیل‌تتراهیدروفولات با خلوص ۹۹/۹۹ درصد، از شرکت سیگما (M0132) تهیه شد و برای تعیین زمان بازداری و تهیه منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت. محلول مادر استاندارد با غلظت ۱/۰۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و برای رسم منحنی کالیبراسیون در محدوده ۷/۳۴ تا ۱۱۷/۵ رقیق شد. سپس شناسایی ۵-متیل‌تتراهیدروفولات در نمونه‌ها بر اساس مقایسه زمان بازداری و طیف ترکیب استاندارد با پیک نمونه انجام گرفت. اعتبارسنجی کامل روش شامل LOD، LOQ، Recovery و Precision انجام نشده است (Zheng *et al*., 2022).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با دو تکرار مستقل انجام و نتایج به‌صورت میانگین دو تکرار گزارش شدند. تحلیل واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار MiniTab (نسخه ۲۱.۳) انجام شد. با این حال n=2 برای ANOVA قدرت آماری محدودی دارد و این یکی از محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد. با توجه به محدودیت تعداد تکرارهای آزمایشگاهی، نتایج آزمون‌های آماری صرفاً برای مقایسه تیمارهای مورد بررسی در محدوده داده‌های حاصل از این مطالعه تفسیر شدند. همچنین، تحلیل مؤلفه‌های اصلی و رگرسیون حداقل مربعات جزئی صرفاً به‌عنوان ابزارهای اکتشافی چندمتغیره برای بررسی الگوهای تغییرات داده‌ها مورد استفاده قرار گرفتند و نتایج حاصل از آن‌ها به‌عنوان مدل‌های پیش‌بینی‌کننده یا استنباط‌های آماری قطعی تفسیر نشدند. ترسیم نمودارها نیز با استفاده

1- 5- Methyltetrahydrofolate

2- High Performance Liquid Chromatography

از نرم‌افزار Excel 2013 انجام شد. تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر اساس ماتریس همبستگی انجام شد؛ بنابراین متغیرها پیش از استخراج مؤلفه‌های اصلی به‌صورت استاندارد شده وارد تحلیل شدند و اثر تفاوت در مقیاس اندازه‌گیری متغیرها حذف شد.

نتایج و بحث

ارزیابی pH و اسیدیته قابل تیتر خمیر ترش‌ها

در جدول ۲ نتایج pH و اسیدیته قابل تیتر خمیر ترش‌ها به‌صورت میانگین دو تکرار گزارش شده است. نتایج نشان داد نمونه خمیر ترش S1 تهیه شده با آرد، آب، سویه‌های لاکتوباسیلوس و مخمر بیشترین میزان تغییر اسیدیته (۸/۸) و pH (۲/۱۲) پس از ۲۰ ساعت تخمیر در دمای ۳۰ ^{o}C نسبت به اسیدیته لحظه شروع نشان داد و دارای بیشترین اسیدیته (۱۳/۴) و کمترین pH (۳/۹۵) می‌باشد و بعد آن به‌ترتیب نمونه S2 و S3 بیشترین اسیدیته و کمترین pH را دارند. کمترین میزان تغییر اسیدیته (۴/۵) و pH (۱/۹۸) پس از ۲۰ ساعت تخمیر در دمای ۳۰ ^{o}C نسبت به اسیدیته لحظه شروع مربوط به نمونه شاهد (S4) می‌باشد و لذا کمترین اسیدیته و بیشترین pH متعلق به نمونه خمیر ترش شاهد S4 تهیه شده از آرد و آب می‌باشد و همچنین نمونه خمیر ترش تهیه شده از آرد، آب و سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک دارای اسیدیته قابل تیتر کمتر و pH بیشتر نسبت به نمونه تهیه شده از باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمر بود.

جدول ۲- نتایج pH و اسیدیته قابل تیتراسیون نمونه‌های خمیر ترش

Table 2- Results of pH and titratable acidity of sourdough samples

		pH	اسیدیته کل Titratable acidity (ml NaOH 0.1 N/10 g dough)	دلتا pH pHΔ	دلتا اسیدیته acidity Δ
آرد Flour		6.45±0.05^{a}	3.87±0.07^{c}	-	-
S1(خمیر ترش تهیه شده از آرد، آب، مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب) S1(Sourdough made from flour, water, yeast, and selected lactic acid bacteria)	شروع تخمیر Start of fermentation	6.07±0.07^{b}	4.6±0.1^{a}	2.12	8.8
	بعد تخمیر After fermentation	3.95±0.5^{b}	13.4±0.3^{a}		
S2(خمیر ترش تهیه شده از آرد، آب و باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب) S2 (Sourdough made from flour, water, and selected lactic acid bacteria)	شروع تخمیر Start of fermentation	6.1±0.00^{b}	4.55±0.05^{a}	2.03	7.15
	بعد تخمیر After fermentation	4.07±0.12^{d}	11.7±0.3^{b}		
S3(خمیر ترش تهیه شده از آرد، آب، مخمر) S3 (Sourdough made from flour, water, yeast)	شروع تخمیر Start of fermentation	6.3±0.05^{a}	4.15±0.05^{b}	2.02	6.3
	بعد تخمیر After fermentation	4.28±0.3^{a}	10.45±0.15^{c}		
S4(خمیر ترش تهیه شده از آرد و آب) S4 (Sourdough made from flour and water)	شروع تخمیر Start of fermentation	6.35±0.05^{a}	4.05±0.05^{bc}	1.98	4.5
	بعد تخمیر After fermentation	4.37±0.1^{b}	8.55±0.35^{c}		

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح α=5% یا (p-value<0.05) می‌باشد.

Unsimilar letters in each column indicate that the means are significant at the α=5% level (p-value <0.05).

که این احتمالا به‌دلیل بر هم کنش متابولیکی میان باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها می‌باشد. بانو و همکاران (Banu *et al.*, 2011) نشان دادند گونه‌های مختلف LAB دمای رشد بهینه متفاوتی دارند؛ بنابراین، دمای تخمیر بر شدت فرآیندهای متابولیکی و بیوسنتز اسیدهای آلی در خمیرترش تأثیر می‌گذارد. به‌طور کلی، مقادیر اسیدیته (TTA) بالاتر و pH پایین‌تر برای خمیرترش تخمیر شده در دمای بالاتر به‌دست می‌آید (Banu *et al.*, 2011).

تخمیر خمیر ترش عموماً با اندازه‌گیری پارامترهایی مانند pH، اسیدیته و میکروبیوتا ارزیابی می‌شود. کیفیت نان عمدتاً به کیفیت خمیر ترش بستگی دارد و به‌صورت منطقه‌ای شامل انواع مختلف LAB و مخمرها می‌شود (Minervini *et al.*, 2012; Gül, Özçelik, Sağdıç, & Certel, 2005). مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک در زیستگاه‌های متنوعی با هم همزیستی دارند (Furukawa, Watanabe, Toyama, & Morinaga, 2013; Frey-Klett *et al.*, 2011). همزیستی و تعاملات آنها بر عملکرد و پایداری اکوسیستم تأثیر می‌گذارد. در اکوسیستم‌های غذایی، آنها مسئول بسیاری از فرآیندهای مختلف از جمله اسیدی شدن، تولید طعم، تولید اتانول و CO_2 و همچنین حفظ زیستی هستند. بنابراین، درک چگونگی تعامل باکتری‌ها و مخمرها نه تنها بر بوم‌شناسی و مکانیسم‌های تعامل آنها تأثیر می‌گذارد، بلکه به ما امکان می‌دهد تا استارترهای میکروبی جدیدی را برای صنعت غذا توسعه دهیم (Deveau *et al.*, 2018). یک جامعه میکروبی متشکل از (LAB) و مخمر مسئول فرآیند تخمیر است (Vogel, *et al.*, 1999). این جوامع میکروبی بسیار ساده هستند و معمولاً حاوی یک گونه مخمر مؤثر و دو گونه LAB مؤثر هستند (Van Kerrebroeck, Maes, & De Vuyst, 2017). با این حال، تنوع میکروبی نسبتاً بالایی هنگام بررسی خمیر ترش‌های مختلف در سراسر جهان توصیف شده است. تاکنون بیش از ۶۰ گونه LAB و ۳۰ گونه مخمر توصیف شده است. بیشتر گونه‌های LAB توصیف شده متعلق به جنس *Lactobacillus* و بیشتر گونه‌های مخمر متعلق به جنس‌های *Saccharomyces*، *Kazachstania*، *Wickerhamomyces*، *Torulaspora* و *Pichia* هستند (Michel De Vuyst *et al*, 2014; *et al.*, 2019).

برهمکنش بین LABها و مخمرها مکانیسم مهمی برای تغییرات مواد مغذی در غذاهای غلات تخمیر شده توسط خمیر ترش است. LABها و مخمرها در یک رابطه همزیستی با هم کار می‌کنند، جایی که هر ارگانیسم از فعالیت‌های دیگری سود می‌برد. LAB ها مسئول تولید اسید لاکتیک هستند، در حالی‌که مخمر CO_2 و اتانول تولید می‌کند (Mendes Ferreira, & Mendes-Faia, 2020). تعامل بین LABها و مخمرها با تخمیر کربوهیدرات‌های موجود در آرد توسط LABها آغاز می‌شود. LAB ها این کربوهیدرات‌ها را از طریق فرآیندی به نام تخمیر اسید لاکتیک به اسیدهای آلی، در درجه اول اسید لاکتیک، تبدیل می‌کنند (Senne de Oliveira Lino, Bajic, Vila, Sánchez, & Sommer, 2021). این اسیدی شدن خمیر، محیطی اسیدی ایجاد می‌کند که برای رشدLAB ها مطلوب و برای رشد میکروارگانیسم‌های نامطلوب بازدارنده است (Xu *et al.*, 2021).

وجود اسید لاکتیک تولید شده توسطLAB ها نیز نقش مهمی در فعالیت مخمرها دارد. مخمرها در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌ها قادر به تحمل سطوح نسبتاً بالای اسید لاکتیک هستند. محیط اسیدی ایجاد شده توسط LAB ها رشد و فعالیت مخمرها را افزایش می‌دهد و به آنها اجازه می‌دهد کربوهیدرات‌ها را تخمیر کرده و CO_2 و اتانول تولید کنند. گاز CO_2 تولید شده توسط مخمرها مسئول اثر ورآورندگی در نان خمیر ترش است و بافت اسفنجی مشخصه را ایجاد می‌کند (Sun *et al.*, 2023).

علاوه بر ایجاد محیط اسیدی، LABها متابولیت‌های مختلفی نیز تولید می‌کنند که در طعم و عطر نان خمیر ترش نقش دارند (Korcari, Ricci, Quattrini, & Fortina, 2020). این متابولیت‌ها شامل اسید استیک، اتانول، دی‌استیل و ترکیبات طعم‌دهنده مختلف هستند. بنابراین، وجودLAB ها در سیستم‌های تخمیر خمیر ترش برای ایجاد طعم و عطر منحصر به فرد مرتبط با نان خمیر ترش بسیار مهم است. باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها می‌توانند از طریق تماس سلول به سلول نیز به‌صورت فیزیکی با هم تعامل داشته باشند. این تعامل فیزیکی ممکن است تبادل متابولیت‌ها را تسهیل کرده و فرآیند کلی تخمیر را افزایش دهد (Wang, Zhang, Liu, Jin, & Xia, 2023).

فعالیت پروتئولیتیک LAB در فرآوری خمیر ترش، تولید پروتئین‌هایی که هضم آسان‌تری دارند را افزایش می‌دهد. همچنین تخمیر خمیر ترش منجر به افزایش قابل توجه قابلیت هضم پروتئین‌های مشتق شده از گندم و محتوای پروتئین محلول می‌شود (Fraberger *et al.*, 2020). این امر را می‌توان به این واقعیت نسبت داد که خمیر ترش، که یک سیستم تخمیر مشترک LAB و مخمر است، تعداد بیشتری اسید آلی تولید می‌کند. این اسیدها فعالیت پروتئازها را در سیستم تخمیر خمیر ترش افزایش می‌دهند، این به نوبه خود، تجزیه پروتئین توسط پروتئازها را افزایش می‌دهد (Hu *et al.*, 2023).

مخمر فقط می‌تواند نشاسته آسیب‌دیده (که گرانول‌های نشاسته غلات هستند که توسط نیروهای مکانیکی در طول آسیاب شکسته شده‌اند) را به‌عنوان منبع قند مصرف کند، در حالی‌که نمی‌تواند از گرانول‌های کامل نشاسته استفاده کند. ترکیب کاهش pH ناشی از اسید لاکتیک و فعال شدن پروتئازهای غلات در طول تخمیر ممکن

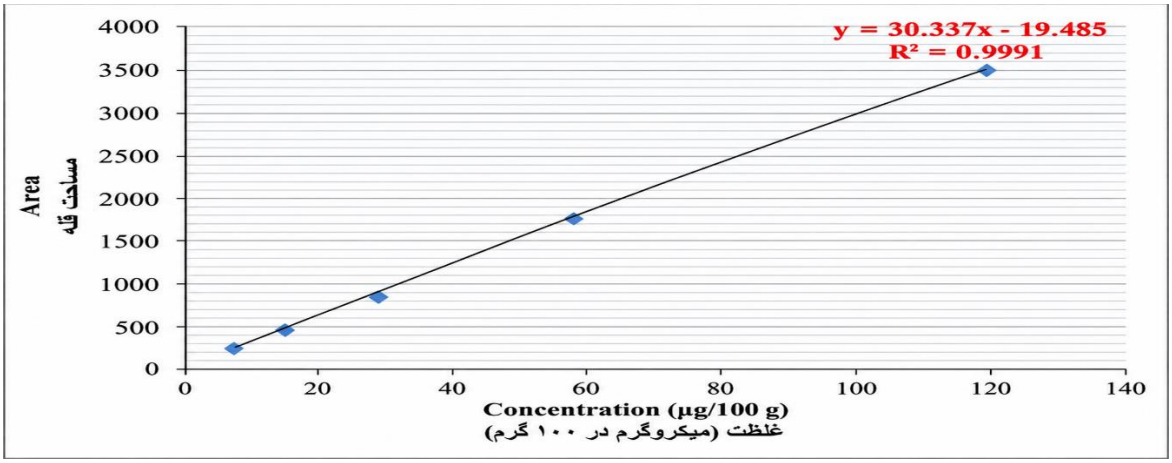
است بر تغییر در مورفولوژی سطح نشاسته تأثیر بگذارد، که می‌تواند تأثیر قابل توجهی داشته باشد (Wang *et al.*, 2021).

برای به دست آوردن سطوح بالای فولات تولید شده توسط LAB، لازم است سویه و بستر مناسب انتخاب شود، دما و زمان تخمیر بهینه شود و افزودن پیش‌سازهای فولات یا سایر ترکیبات در نظر گرفته شود (Laiño, LeBlanc, & Savoy de Giori, 2012; Saubade, Hemery, Guyot, & Humblot, 2017). باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده فولات جنس‌ها و گونه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک، فولات درون سلولی و برون سلولی تولید می‌کنند و این توانایی به شدت به سویه وابسته است (Laiño *et al.*, 2012; Greppi, Hemery, Berrazaga, Almaksour, & Humblot, 2017).

باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده فولات را می‌توان در سطوح مختلف از منابع مختلف، از جمله منابع غذایی (خام یا تخمیر شده) و دستگاه گوارش جدا کرد. سویه‌های به‌دست‌آمده از دستگاه گوارش می‌توانند به‌عنوان پروبیوتیک‌های تولیدکننده فولات استفاده شوند، در حالی‌که سویه‌های جداشده از غذاهای تخمیر شده می‌توانند به‌عنوان میکروب‌های آغازگر برای تولید محصولات غذایی غنی از فولات استفاده شوند (Rossi, Amaretti, & Raimondi, 2011).

نتایج اندازه‌گیری میزان فولات (۵-متیل‌تتراهیدرو فولات) با روش HPLC

با کمک نمودار استاندارد فولات (شکل ۲) به‌دست آمده توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و با مقایسه زمان بازداری و سطح زیر پیک منحنی کروماتوگرام‌های نمونه‌ها با کروماتوگرام استاندارد و با در نظر گرفتن میزان بازیابی محاسبه شده در این روش و همچنین اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر میزان فولات (۵-متیل‌تتراهیدروفولات) موجود در نمونه‌ها محاسبه شد. ۵-متیل‌تتراهیدروفولات فعال‌ترین شکل بیولوژیکی فولات طبیعی و شکل غالب فولات در اکثر گیاهان است، زیرا می‌تواند توسط بدن برای فرآیندهای بیوشیمیایی مختلف مورد استفاده قرار گیرد (Liu, Edelmann, Piironen, & Kariluoto, 2022).



شکل ۲- نمودار استاندارد 5-MTHF به دست آمده توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی

Fig. 2. 5-MTHF standard diagram obtained by high-performance liquid chromatography method

نتایج اندازه‌گیری میزان فولات (۵-متیل‌تتراهیدرو فولات) با روش HPLC برای نمونه‌های خمیر ترش

در جدول ۳ نتایج اندازه‌گیری میزان 5-MTHF با روش HPLC برای نمونه‌های خمیر ترش به‌صورت میانگین دو تکرار گزارش شده است. نتایج نشان داد بیشترین میزان تولید 5-MTHF پس از ۲۰ ساعت تخمیر در دمای ۳۰ °C نسبت به 5-MTHF لحظه شروع متعلق به نمونه S1 (خمیر ترش تهیه شده از آرد، آب، مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب) می‌باشد و بعد آن نمونه S2 (خمیر ترش تهیه شده از آرد، آب و باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب) و S3 (خمیر ترش تهیه شده از آرد، آب، مخمر) بیشترین میزان 5-MTHF تولیدی را داشتند و کمترین میزان تولید 5-MTHF برای نمونه S4 (خمیر ترش تهیه شده از آرد، آب) بدست آمد.

جدول ۳- نتایج اندازه‌گیری میزان 5-MTHF با روش HPLC برای نمونه‌های خمیر ترش

Table 3- Results of 5-MTHF measurement levels by HPLC method for sourdough samples

خمیر ترش Sourdough		۵-متیل‌تتراهیدرو فولات Total 5-MTHF (micrograms per 100 grams)
آرد Flour		2.6 ± 0.4[c]
S1(خمیر ترش تهیه شده از آرد،آب،مخمر و باکتری های اسید لاکتیک منتخب) S1(Sourdough made from flour, water, yeast, and selected lactic acid bacteria)	شروع تخمیر Start of fermentation	5 ± 0.2[a]
	بعد تخمیر After fermentation	14.04±0.02[a]
S2(خمیر ترش تهیه شده از آرد،آب و باکتری های اسید لاکتیک منتخب) S2 (Sourdough made from flour, water, and selected lactic acid bacteria)	شروع تخمیر Start of fermentation	4.7±0.2[ab]
	بعد تخمیر After fermentation	13.44±0.07[b]
S3(خمیر ترش تهیه شده از آرد، آب، مخمر) S3 (Sourdough made from flour, water, yeast)	شروع تخمیر Start of fermentation	4.65±0.15[ab]
	بعد تخمیر After fermentation	13.05±0.1[c]
S4(خمیر ترش تهیه شده از آرد و آب) S4 (Sourdough made from flour and water	شروع تخمیر Start of fermentation	4.11±0.13[b]
	بعد تخمیر After fermentation	10.31±0.02[d]

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح α=5% یا (p-value<0.05) می‌باشد.

Unsimilar letters in each column indicate that the means are significant at the α=5% level (p-value <0.05).

تیمار حاوی مخمر و LAB منتخب، بیشترین مقدار ۵-MTHF را در میان تیمارهای بررسی‌شده نشان داد. بیشترین میزان 5-MTHF در تخمیرهای مخمری و LAB خمیر ترش‌ها یافت شد که با یافته‌های قبلی مطابقت دارد (Lopez *et al*., 2001; Osseyi, Wehling, & Albrecht, 2001). همچنین اعتقاد بر این است که LAB ها ممکن است اثرات محافظتی برای مخمرها ایجاد کنند و تحمل آنها را در برابر تنش‌های محیطی مانند اسیدیته بالا افزایش دهند (Viesser *et al*., 2021). همچنین در تحقیقات قبلی محققان به این نتیجه رسیدند که وارد کردن مخمر در ترکیب و فرمولاسیون خمیر منجر به میزان فولات بالاتر در نان حاصل از آن خمیر خواهد شد. بنابراین به نظر می‌رسد میزان فولات در نان حاصل از این خمیر ترش، نه تنها از آرد اولیه حاصل می‌شود بلکه از مخمر به کار رفته در فرمولاسیون هم منتج می‌گردد. افزایش میزان فولات نشان داده شده مطابق با نتایج منتشر شده توسط گوجسکا و ماجوسکا (Gujska, & Majewska, 2005) علت آن را می‌توان تولید فولات به‌وسیله مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک طی فرآیند تخمیر عنوان کرد. همچنین نتایج تحقیقات پاترینگ و همکاران (Patring, Jastrebova, Hjortmo, Andlid, & Jägerstad, 2005) نشان داد که خود مخمر مورد استفاده در تهیه نان نیز دارای مقدار ۱-۴ میلی‌گرم در هر۱۰۰ گرم، اسید فولیک تولید می‌کند. همچنین در برخی از مطالعات، نتایجی متفاوت با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر، مشاهده شده است که میزان فولات در خمیر ترش دارای باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمر، کمتر از میزان فولات در خمیر ترش حاصل از مخمر به تنهایی است. این امر احتمالا به این دلیل است که باکتری‌های اسید لاکتیک رشد کننده در خمیر ترش می‌توانند فولات سنتز شده توسط مخمرها را مصرف کنند.

نتایج اندازه‌گیری میزان 5-MTHF با روش HPLC برای نمونه‌های نان تولیدی با خمیر ترش‌های مختلف

در جدول ۴ نتایج اندازه‌گیری میزان 5-MTHF با روش HPLC برای نمونه‌های خمیر (تخمیر نهایی) قبل پخت و نان تولیدی با خمیر ترش‌های مختلف به‌صورت میانگین دو تکرار گزارش شده است. نتایج نشان داد بیشترین میزان 5-MTHF متعلق به نمونه خمیر و نانB1 (نان تهیه شده از خمیر ترش S1) می‌باشد و بعد آن نمونه نان B3 و B2 بیشترین مقدار 5-MTHF را داشت و کمترین میزان 5-MTHF از نمونه نان B4 بدست آمد.

جدول ٤- نتایج اندازه‌گیری میزان 5-MTHF با روش HPLC برای نمونه‌های نان تولیدی

Table 4- Results of 5-MTHF measurement levels by HPLC method for Proofed dough and produced bread samples

نان (در حضور مخمر نهایی ثابت) Bread	خمیر استراحت داده شده Proofed dough	۵-متیل‌تترا هیدرو فولات (میکروگرم در ۱۰۰ گرم) Total 5-MTHF
B1(نان تهیه شده ازخمیر ترش S1) B1 (Bread made from sourdough S1)	13.55±0.12^{ab}	13.32±0.19^{a}
B2(نان تهیه شده از خمیر ترش S2 در حضور مخمر نهایی ثابت) B2 (Bread made from sourdough S2)	12.95±0.09^{a}	10.19±0.04^{d}
B3(نان تهیه شده از خمیر ترش S3) B3 (Bread made from sourdough S3)	12.61±0.76^{b}	12.02±0.17^{b}
B4(نان تهیه شده از خمیر ترش S4) B4 (Bread made from sourdough S4)	11.22±0.39^{c}	8.51±0.08^{e}

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح α=5% یا (p-value<0.05) می‌باشد.

Unsimilar letters in each column indicate that the means are significant at the α=5% level (p-value <0.05).

در نان B3 که حاصل از خمیر ترش S3 می‌باشد مقدار 5-MTHF بیشتر از نمونه نان B2 می‌باشد. چون در نمونه نان B3، مخمر وجود دارد و افزایش 5-MTHF عمدتا در ارتباط با رشد مخمر می‌باشد. این درحالیست که در مرحله خمیر استراحت داده شده، میزان 5-MTHF خمیر نان B2 بیشتر از خمیر نان B3 است. مخمر قادر به جبران افت فولات در اثر پخت نان می‌باشد نه تنها بوسیله میزان بالای فولات داخل خودش، بلکه بوسیله سنتز کردن فولات. افزودن مخمر منجر به افزایش محتوای فولات نان شده از این‌رو بخشی از فولات موجود در نان از مخمر و بخشی از سویه‌های LAB نیز ناشی می‌شود. این مشاهده با نتایج قبلی (Butterfield, & Calloway, 1972; Keagy, Stokstad, & Fellers, 1975) مطابقت دارد که تخمین زده بودند ۵۳ تا ۶۵ درصد فولات موجود در نان گندم از مخمر ناشی می‌شود و نان حاوی فولات بیشتری نسبت به آرد آن است.

جدول ۵ نتایج اندازه‌گیری میزان 5-MTHF با روش HPLC در مراحل مختلف تولید و فرآوری نان از میزان 5-MTHF آرد، خمیر ترش نقطه شروع تخمیر، بعد ۲۰ ساعت تخمیر در دمای ۳۰ $^{\circ}$C و خمیر بعد تخمیر نهایی قبل پخت و تولید نان را برای نمونه‌های نان تولیدی با خمیر ترش‌های مختلف به‌صورت میانگین دو تکرار گزارش شده است. نتایج نشان می‌دهد بهترین عملکرد نمونه نان تهیه شده از ترکیب لاکتوباسیلوس‌های منتخب و مخمر نانوایی می‌باشد و بیشترین میزان 5-MTHF را نمونه نان B1 (نان تهیه شده از خمیر ترش S1) می‌باشد و کمترین میزان 5-MTHF از نمونه نان شاهد B4 بدست آمد.

مقایسه میانگین نتایج اندازه‌گیری میزان 5-MTHF برای نمونه‌های خمیر ترش و نان نشان می‌دهد که نمونه‌های خمیر ترش و نان حاوی سویه‌های لاکتوباسیلوس و مخمر بیشترین میزان 5-MTHF تولیدی را دارند. هجرتمو و همکاران (Hjortmo, Patring, Jastrebova, & Andlid, 2008) نشان دادند که میزان 5-MTHF نان گندم سفید تخمیر شده با سویه *ساکارومایسس سرویزیه*، که در محیط‌کشت تخصصی کشت داده شده و در طول مرحله تخمیر تنفسی قبل از آماده‌سازی خمیر برداشت شده بود، در مقایسه با نان تخمیر شده با مخمر نانوایی تجاری، سه تا پنج برابر بیشتر بود.

افزایش محتوای فولات در طول تخمیر خمیر ترش می‌تواند از دست دادن فولات در مراحل دیگر فرآیند پخت را جبران کند (Kariluoto *et al*., 2004). افت فولات در طی پخت در این مطالعه ۱/۶۹ تا ۲۴/۱۵ درصد بود (جدول ۵)، اگرچه ثابت نبود و بیشترین میزان کاهش فولات در پخت متعلق به نمونه نان B4 (۲۴/۱۵) بود و کمترین کاهش فولات در طی پخت متعلق به نمونه نان B1 (۱/۶۹) بود که ناشی از حساسیت این ویتامین (فولات) در برابر حرارت و فرآیند پخت است. از آنجاکه نمونه نان B1 بیشترین میزان فولات را دارا می‌باشد و از طرف دیگر کمترین افت فولات را در طی پخت نان داشته است (جدول ۵). می‌توان نتیجه گرفت که فولات تولیدی از رابطه مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب، تیمار B1 کمترین درصد کاهش ۵-متیل تترا هیدرو فولات را بین خمیر نهایی و نان پخته‌شده نشان داد میزان این ضایعات با ضایعات گزارش‌شده قبلی توسط پژوهشگران (۲۰ تا ۳۴ درصد) برای نان گندم مطابقت دارد (Butterfield, & Calloway, 1972; Keagy *et al*., 1975; Osseyi *et al*., 2001; Arcot, Wootton, Alury, Chan, & Shrestha, 2002).

برخی از باکتری‌های تولیدکننده‌ی فولات می‌توانند فولات را فراتر از نیازهای رشد خود سنتز کنند و تحت تأثیر وجود یا عدم وجود فولات در محیط‌کشت قرار نمی‌گیرند (Pompei *et al*., 2007). این باکتری‌های تولیدکننده‌ی بیش از حد فولات را می‌توان به‌طور طبیعی یافت (Albano, Silvetti, & Brasca, 2020; Greppi *et al*., 2017) با این حال، غنی‌سازی اجباری با اسید فولیک ممکن است باعث مصرف بیش از حد اسید فولیک در بین جمعیت شود، به خصوص اگر مکمل‌های غذایی اسید فولیک به‌طور همزمان مصرف شوند (Maruvada *et al*., 2020).

جدول ۵- نتایج اندازه‌گیری سطوح 5-MTHF در مراحل مختلف نمونه‌های نان تولید شده. (میکروگرم در ۱۰۰ گرم)

Table 5- Results of 5-MTHF measurement levels stages produced bread samples. Total folate (micrograms per 100 grams)

نمونه های نان Bread samples	آرد Flour	شروع تخمیر Start of fermentation	بعد تخمیر After fermentation	خمیر استراحت داده شده Proofed dough	نان Bread	درصد از دست دادن 5- MTHF در طول پخت % Loss of 5-MTHF during baking
B1(نان تهیه شده از خمیر ترش S1) B1 (Bread made from sourdough S1)	2.6 ± 0.4^{c}	5 ± 0.2^{a}	14.04±0.02^{a}	13.55±0.12^{ab}	13.32±0.19^{a}	1.69
B2(نان تهیه شده از خمیر ترش S2) B2 (Bread made from sourdough S2)	2.6 ± 0.4^{c}	4.7±0.2^{ab}	13.44±0.07^{b}	12.95±0.09^{a}	10.19±0.04^{d}	21.31
B3(نان تهیه شده از خمیر ترش S3) B3 (Bread made from sourdough S3)	2.6 ± 0.4^{c}	4.65±0.15^{ab}	13.05±0.1^{c}	12.61±0.76^{b}	12.02±0.17^{b}	4.67
B4(نان تهیه شده از خمیر ترش S4) B4 (Bread made from sourdough S4)	2.6 ± 0.4^{c}	4.11±0.13^{b}	10.31±0.02^{d}	11.22±0.39^{c}	8.51±0.08^{e}	24.15

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح (α=5%) مقدار ($p < 0.05$) است.

Unsimilar letters in each column indicate that the means are significant at the α=5% level (p-value <0.05).

مصرف بیش از حد اسید فولیک ممکن است کمبود ویتامین B12 را پنهان کند (Smith, 2007). مصرف بیش از حد اسید فولیک می‌تواند باعث افزایش سطح بالای اسید فولیک متابولیزه نشده در سرم شود که با ایجاد انواع خاصی از سرطان، مانند سرطان روده بزرگ، مرتبط است. بنابراین، ممکن است برای عموم مردم مصرف فولات کافی از غذاهای طبیعی به جای غذاهای غنی شده ایمن‌تر باشد (Moazzen, Dastgiri, Dolatkhah, Alizadeh, & de Bock, 2021; Miller & Ulrich, 2013).

از آنجاکه مطالعات فراهمی زیستی پرهزینه و زمان‌بر هستند، بررسی فراهمی زیستی خارج از دامنه مطالعه حاضر بوده است. مطالعات دسترسی زیستی برای تولید فرضیه‌ها و غربالگری نمونه‌ها مفید هستند. با این حال، مطالعات در مورد دسترسی زیستی فولات مواد غذایی هنوز نادر است. اوهرویک و همکاران (Ö hrvik *et al*., 2018) گزارش دادند که حدود ۸۰٪ فولات موجود در نان از نظر زیستی قابل دسترسی است.

علاوه بر این، با مطالعه‌ی پایداری ویتامین‌های فولات به‌صورت جداگانه در طول هضم، نتایج آنها از این ایده پشتیبانی کرد که هم ساختار غذا و هم پایداری فولات بر دسترسی زیستی فولات تأثیر می‌گذارند. پایداری ویتامین‌های فولات در طول هضم در ماتریس‌های غذایی مختلف متفاوت است. نان منبع مهمی از فولات غذایی است که به‌طور گسترده در سراسر جهان مصرف می‌شود. مطالعات نشان داده است که پایداری ۵-متیل تتراهیدروفولات برای دسترسی زیستی فولات در نان بسیار مهم است و روش‌های پایدارسازی این ویتامین باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد (Liu *et al*., 2022).

تحلیل مؤلفه‌های اصلی

به‌منظور بررسی همزمان اثر فرمولاسیون‌های مختلف خمیرترش بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و تغییرات میزان 5-MTHF طی فرآیند تخمیر و پخت نان، از تحلیل مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. این روش آماری چندمتغیره امکان کاهش ابعاد داده‌ها، شناسایی روابط میان متغیرها و تعیین الگوهای حاکم بر رفتار نمونه‌ها را فراهم می‌کند. در این تحلیل، متغیرهای شامل اسیدیته اولیه و نهایی خمیرترش، درصد تغییرات اسیدیته، pH اولیه و نهایی، درصد تغییرات pH، میزان فولات در آغاز و پایان تخمیر خمیرترش، درصد تغییرات فولات خمیرترش، میزان فولات نهایی خمیر بعد تخمیر نهایی و نان و درصد افت فولات طی فرآیند پخت وارد مدل شدند.

نتایج تحلیل PCA نشان داد که دو مؤلفه اصلی نخست توانستند ۹۴/۹ درصد از کل تغییرات داده‌ها را توضیح دهند، به‌طوری‌که مؤلفه اول (PC1) و مؤلفه دوم (PC2) به‌ترتیب ۸۱/۱ و ۱۳/۸ درصد از واریانس کل را تبیین کردند. سهم بالای دو مؤلفه اول نشان می‌دهد که بخش عمده تغییرات موجود در داده‌های این مطالعه توسط این دو

مؤلفه قابل توصیف است. با این حال، با توجه به تعداد محدود نمونه‌ها، نتایج PCA صرفاً در سطح اکتشافی تفسیر شدند.

بررسی بارهای عاملی (loadings) نشان داد (جدول ۶) که مؤلفه اول عمدتاً تحت تأثیر متغیرهای مرتبط با شدت تخمیر قرار دارد. متغیرهایی نظیر اسیدیته نهایی خمیرترش، درصد تغییرات اسیدیته، میزان فولات در پایان تخمیر و درصد افزایش فولات دارای بار مثبت بالا بودند، در حالی‌که pH اولیه و نهایی بار منفی نشان دادند.

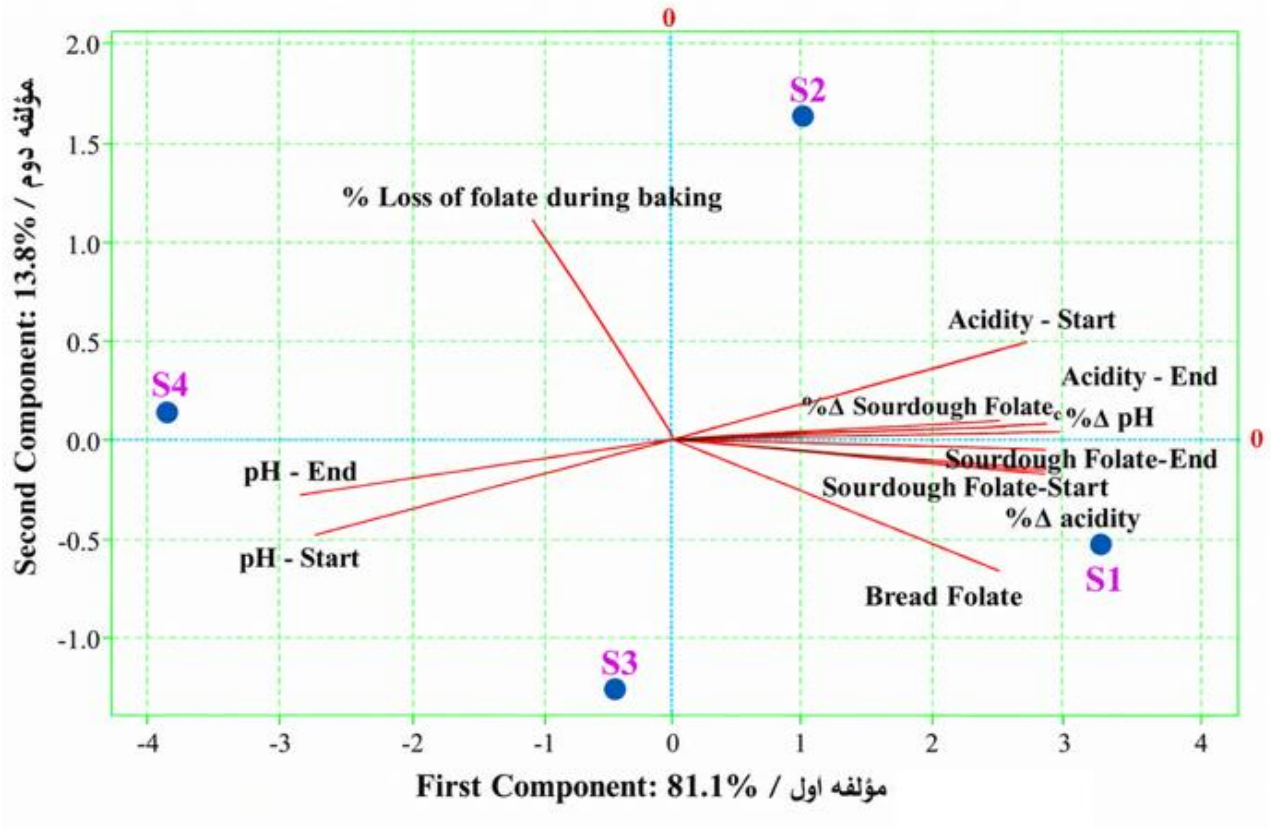
جدول ٦- بارهای عاملی متغیرها در مؤلفه‌های اصلی حاصل از تحلیل مؤلفه‌های اصلی

Table 6- Loadings of the variables on the principal components obtained from principal component analysis

Variable	PC1	PC2	PC3
Acidity – Start اسیدیته – شروع	0.304	0.322	−0.167
Acidity – End اسیدیته – پایان	0.333	0.028	−0.122
%Δ Acidity درصد تغییر اسیدیته	0.331	−0.116	−0.037
pH – Start pH – شروع	−0.305	−0.315	0.179
pH – End pH – پایان	−0.319	−0.183	0.263
%Δ pH درصد تغییر pH	0.323	0.052	−0.348
Sourdough Folate – Start فولات خمیرترش – شروع	0.330	−0.102	0.136
Sourdough Folate – End فولات خمیرترش – پایان	0.321	−0.032	0.373
%Δ Sourdough Folate درصد تغییر فولات خمیرترش	0.282	0.064	**0.711**
Bread Folate فولات نان	0.283	−0.433	0.075
% Loss of Folate during Baking درصد اتلاف فولات طی پخت	−0.125	**0.737**	0.255
Eigenvalue مقدار ویژه	8.9166	1.5179	0.5655
Explained variance (%) درصد واریانس توضیح‌داده‌شده	81.1	13.8	5.1
Cumulative variance (%) درصد واریانس تجمعی	81.1	94.9	100.0

توجه: مقادیر نشان‌دهنده بارهای عاملی (Eigenvectors) هر متغیر در مؤلفه‌های اصلی هستند. مقادیر با قدر مطلق ≥ ۰.۵۰ به‌صورت پررنگ نشان داده شده‌اند و به‌عنوان بارهای عاملی نسبتاً قوی در نظر گرفته شده‌اند. سه مؤلفه اصلی در مجموع ۱۰۰.۰٪ از واریانس کل داده‌ها را توضیح می‌دهند.

Note: Values represent the loadings (eigenvectors) of each variable on the principal components. Loadings with an absolute value ≥0.50 are presented in bold and were considered relatively strong loadings. The three principal components collectively explained 100.0% of the total variance.



شکل ۳- نمودار دوجانبه (Biplot) تحلیل مؤلفه‌های اصلی شامل امتیازهای نمونه‌ها (Scores) و بردارهای بارگذاری متغیرها (Loading vectors) بر اساس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و پارامترهای مرتبط با فولات در نمونه‌های خمیرترش و نان تهیه‌شده با فرمولاسیون‌های مختلف استارتر

هر نقطه نشان‌دهنده میانگین یک تیمار (S1–S4) بوده و بردارها متغیرهای اندازه‌گیری‌شده و میزان مشارکت آن‌ها در تفکیک تیمارها در فضای PCA را نشان می‌دهند. تیمارها شامل S1 (آرد، آب، مخمر و باکتری‌های منتخب اسید لاکتیک)، S2 (آرد، آب و باکتری‌های منتخب اسید لاکتیک)، S3 (آرد، آب و مخمر) و S4 (آرد و آب) بودند.

Fig. 3. PCA biplot showing the distribution of the four sourdough starter formulations (scores) based on physicochemical and folate-related variables and the corresponding variable vectors (loadings)

Each point represents the mean values of one treatment (S1–S4), while the arrows indicate the contribution and direction of the measured variables to sample discrimination. Treatments were as follows: S1, flour, water, yeast, and selected lactic acid bacteria; S2, flour, water, and selected lactic acid bacteria; S3, flour, water, and yeast; and S4, flour and water.

این الگو نشان می‌دهد که PC1 عمدتاً با متغیرهای مرتبط با شدت تغییرات تخمیری و وضعیت فولات در طی تخمیر همراه است. هم‌جهتی اسیدیته و متغیرهای مرتبط با افزایش فولات و در مقابل، جهت مخالف pH، نشان‌دهنده ارتباط بین شدت اسیدی‌شدن خمیرترش و تغییرات فولات در طی تخمیر است. با این حال، PCA ماهیت اکتشافی داشته و این روابط را نمی‌توان به‌عنوان شواهد مستقیم از رابطه علّی بین فعالیت میکروبی و سنتز فولات تفسیر کرد.

در نمودار PCA، (شکل ۳) نمونه S1 (خمیرترش تهیه‌شده از آرد، آب، مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب) در ناحیه‌ای از نمودار قرار گرفت که با بردارهای اسیدیته و غلظت فولات در پایان تخمیر و نان نهایی هم‌جهت بود. این آرایش نشان‌دهنده همراهی این نمونه با مقادیر بالاتر این متغیرها در مقایسه با سایر تیمارها است. تیمار S1، که حاوی مخمر و سویه‌های منتخب باکتری‌های اسید لاکتیک بود، بالاترین مقدار فولات را در پایان تخمیر در میان تیمارهای بررسی‌شده نشان داد. این یافته نشان می‌دهد که حضور همزمان این دو گروه میکروبی در شرایط آزمایشی حاضر با افزایش مقدار فولات همراه بود؛ با این حال، با توجه به اینکه اثر متقابل LAB×yeast به‌طور مستقل مورد آزمون آماری قرار نگرفت، نمی‌توان از این نتیجه اثر هم‌افزایی میان این دو گروه میکروبی را استنباط کرد.

تیمار S2، حاوی LABهای منتخب و فاقد مخمر، مقدار فولات کمتری نسبت به S1 نشان داد. این اختلاف نشان‌دهنده تفاوت عملکرد این دو فرمولاسیون در شرایط آزمایشی حاضر است؛ با این حال، از آنجاکه اثر متقابل LAB و مخمر به‌طور آماری آزمون نشد، نمی‌توان کاهش مشاهده‌شده را به اثر مستقیم یا هم‌افزایی مخمر نسبت داد.

تیمار S3، حاوی مخمر و فاقد LAB منتخب، نیز مقدار فولات بالاتری نسبت به تیمار شاهد S4 نشان داد، در حالی‌که مقدار فولات آن از S1 کمتر بود. بنابراین، در شرایط آزمایشی حاضر، تیمار حاوی همزمان مخمر و LAB منتخب (S1) بالاترین مقدار فولات را نشان داد؛ با این حال، این الگو به‌تنهایی برای استنتاج اثر هم‌افزایی یا تعامل آماری میان دو گروه میکروبی کافی نیست.

نمونه شاهد S4 (خمیرترش تهیه شده از آرد و آب) به‌دلیل عدم حضور مخمر و باکتری‌های منتخب، کمترین میزان اسیدیته، کمترین تغییرات متابولیکی و پایین‌ترین میزان فولات را نشان داد و احتمالاً در جهت منفی PC1 قرار گرفته است. این موضوع بیانگر آن است که نبود میکروارگانیسم‌های آغازگر فعال، فرآیند تخمیر را محدود کرده و در نتیجه ظرفیت غنی‌سازی زیستی فولات کاهش یافته است.

مؤلفه دوم (PC2) عمدتاً با تغییرات مرتبط با فولات طی فرآیند پخت همراه بود. درصد افت فولات طی پخت دارای بار مثبت نسبتاً بالایی در این مؤلفه (۰/۷۳۷) بود، در حالی‌که میزان فولات نان بار منفی داشت (۰/۴۳۳-). بنابراین، PC2 را می‌توان عمدتاً به‌عنوان مؤلفه‌ای مرتبط با الگوی تغییر و افت فولات طی فرآیند پخت در نظر گرفت. در این چارچوب، قرارگیری نمونه‌ها در امتداد مثبت یا منفی PC2 با تفاوت در میزان افت فولات و مقدار فولات باقی‌مانده در نان همراه بود. با این حال، این الگو به‌تنهایی برای استنباط یا اثبات پایداری حرارتی فولات کافی نیست و از این رو، از تفسیر PC2 به‌عنوان شاخص پایداری حرارتی اجتناب شد.

در میان تیمارها، نمونه S1/B1 کمترین درصد کاهش فولات را بین خمیر نهایی و نان پخته‌شده نشان داد و همزمان از میزان بالاتری از فولات نهایی نان برخوردار بود. این یافته نشان‌دهنده حفظ مقدار بیشتری از فولات طی فرآیند پخت در این تیمار است. با این حال، بر اساس داده‌های حاضر نمی‌توان این مشاهده را به‌عنوان شواهدی قطعی از پایداری حرارتی بالاتر فولات تفسیر کرد. در مقابل، نمونه S2/B2 با وجود میزان نسبتاً بالای فولات در خمیر نهایی، درصد کاهش بیشتری از فولات را طی پخت نشان داد که بیانگر تفاوت در میزان فولات باقی‌مانده پس از پخت در مقایسه با سایر تیمارها است.

به‌طور کلی، نتایج تحلیل PCA نشان داد که نوع فرمولاسیون خمیرترش با تفاوت در ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سیستم و میزان فولات در مراحل مختلف فرآیند مرتبط بود. حضور همزمان مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب در نمونه S1 با مقادیر بالاتر اسیدیته، افزایش بیشتر فولات طی تخمیر و میزان بالاتر فولات در نان همراه بود. همچنین، S1/B1 کمترین درصد کاهش فولات را بین خمیر نهایی و نان پخته‌شده نشان داد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که استفاده از کشت‌های ترکیبی مخمر و LABهای تولیدکننده فولات می‌تواند یک رویکرد امیدوارکننده برای افزایش محتوای فولات در نان‌های فراسودمند باشد.

رگرسیون حداقل مربعات جزئی

به‌منظور بررسی اکتشافی روابط چندمتغیره میان ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خمیرترش و میزان فولات نهایی نان، از رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLSR) استفاده شد. این روش کمومتریک امکان بررسی همزمان روابط میان چند متغیر پیش‌بین و یک متغیر پاسخ را فراهم می‌کند و در شرایطی که متغیرهای پیش‌بین دارای همبستگی باشند، می‌تواند به‌عنوان یک ابزار اکتشافی مفید مورد استفاده قرار گیرد. در سیستم‌های تخمیری، پارامترهایی نظیر pH، اسیدیته و میزان فولات ممکن است با یکدیگر همبستگی داشته باشند؛ ازاین‌رو، PLSR برای بررسی الگوهای چندمتغیره موجود در مجموعه داده حاضر به کار گرفته شد.

در مقابل، PLSR با استخراج متغیرهای پنهان، امکان مدل‌سازی روابط میان متغیرهای مستقل و پاسخ را در شرایط وجود هم‌خطی چندگانه فراهم می‌کند و نسبت به رگرسیون خطی کلاسیک حساسیت کمتری به هم‌خطی بین متغیرهای پیش‌بین دارد.

با توجه به اینکه این مطالعه تنها شامل چهار تیمار آزمایشی (S1 تا S4) بود، تحلیل PLSR صرفاً به‌عنوان یک تحلیل اکتشافی و برای بررسی الگوهای ارتباطی موجود در مجموعه داده انجام شد. بنابراین، نتایج حاصل از این تحلیل نباید به‌عنوان یک مدل پیش‌بینی‌کننده معتبر یا قابل تعمیم تلقی شوند. مقادیر R^2 صرفاً میزان برازش مدل به داده‌های موجود را نشان می‌دهند و در شرایط حاضر نمی‌توان از آن‌ها برای ارزیابی قابلیت پیش‌بینی یا برتری یک مدل نسبت به مدل دیگر استفاده کرد. همچنین، با توجه به تعداد محدود مشاهدات و استفاده از سه متغیر پیش‌بین در هر مدل، ضرایب رگرسیونی و جهت روابط تنها به‌صورت توصیفی و در چارچوب مجموعه داده حاضر مورد بررسی قرار گرفتند. تأیید روابط مشاهده‌شده و ارزیابی قابلیت پیش‌بینی مدل‌ها مستلزم استفاده از تعداد بیشتری نمونه و اعتبارسنجی مستقل در مطالعات آینده است.

در این مطالعه، میزان فولات نهایی نان به‌عنوان متغیر پاسخ (Y) در نظر گرفته شد و دو مدل مستقل شامل مدل مبتنی بر ویژگی‌های نهایی تخمیر و مدل مبتنی بر تغییرات دینامیکی طی فرآیند تخمیر توسعه یافتند. هدف از طراحی این دو مدل، بررسی همزمان نقش «وضعیت نهایی سیستم تخمیر» و همچنین «شدت تغییرات متابولیکی طی تخمیر» در تعیین میزان فولات نهایی نان بود.

در مدل اول، ویژگی‌های نهایی خمیرترش شامل اسیدیته نهایی، pH نهایی و میزان فولات در پایان تخمیر به‌عنوان متغیرهای پیش‌بین وارد مدل شدند. معادله حاصل به‌صورت زیر به دست آمد:

$$\text{Bread Folate}=-172.22+4.513(\text{Acidity-End})+34.234(\text{pH-End})-0.724(\text{Sourdough Folate-End})$$

این مدل دارای ضریب تعیین (R^2) برابر با ۷۷/۵۴ درصد بود. با این حال، با توجه به محدود بودن تعداد مشاهدات، این مقدار صرفاً بیانگر میزان برازش مدل بر داده‌های موجود است و نباید به‌عنوان شاخصی از توان پیش‌بینی مدل تفسیر شود. ضرایب مدل نشان دادند که در داده‌های این مطالعه، اسیدیته نهایی با مقادیر بالاتر فولات نهایی نان همراه بود. با این حال، به‌دلیل همبستگی زیاد میان متغیرهای pH، اسیدیته و فولات، ضرایب رگرسیونی نباید به‌صورت مستقل یا به‌عنوان شواهدی از رابطه علت و معلولی تفسیر شوند. این موضوع بیانگر آن است که افزایش شدت اسیدی شدن خمیرترش، که ناشی از فعالیت متابولیکی بیشتر باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها می‌باشد، می‌تواند شرایط مناسب‌تری را برای سنتز و تجمع فولات فراهم کند. تولید اسیدهای آلی طی تخمیر نه تنها موجب کاهش pH محیط می‌شود، بلکه از طریق تحریک فعالیت میکروبی و فعال‌سازی مسیرهای متابولیکی مرتبط با سنتز ویتامین‌ها، موجب افزایش غنی‌سازی زیستی فولات نیز می‌گردد. از سوی دیگر، ارتباط میان pH نهایی و میزان فولات نهایی نان نشان داد که تغییرات محیط اسیدی نقش کلیدی در کنترل فعالیت میکروارگانیسم‌ها و بازده تولید فولات ایفا می‌کند. اگرچه ضریب pH در مدل مثبت مشاهده شد، اما با توجه به وجود همبستگی بالا میان pH، اسیدیته و فولات، تفسیر این ضرایب باید در چارچوب ساختار کلی مدل و روابط چندمتغیره انجام شود. نتایج حاصل از PCA نیز نشان داده بود که متغیرهای مرتبط با pH در جهت مخالف متغیرهای اسیدیته و فولات قرار گرفته‌اند که بیانگر رابطه معکوس میان کاهش pH و افزایش غنی‌سازی زیستی فولات می‌باشد. بنابراین، مدل اول عمدتاً بیانگر نقش وضعیت نهایی سیستم تخمیر در تعیین کیفیت تغذیه‌ای نان است و نشان می‌دهد که شرایط نهایی خمیرترش، به‌ویژه شدت اسیدی شدن، یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده میزان فولات محصول نهایی می‌باشد. از آنجاکه pH و اسیدیته هر دو شاخص‌هایی از وضعیت اسیدی سیستم بوده و همبستگی بالایی با یکدیگر دارند، احتمال وجود هم‌خطی چندگانه در مدل وجود دارد. اگرچه PLSR نسبت به رگرسیون کلاسیک مقاومت بیشتری در برابر هم‌خطی دارد، اما این موضوع می‌تواند بر ضرایب رگرسیون اثر گذاشته و تفسیر مستقل هر متغیر را محدود کند. از این رو، هر دو متغیر در مدل حفظ شدند تا اطلاعات مرتبط با وضعیت اسیدی سیستم از دست نرود و ضرایب رگرسیونی نیز صرفاً در چارچوب مدل اکتشافی حاضر و بدون تفسیر مستقل یا علت و معلولی هر متغیر بررسی شدند.

در مدل دوم، به جای استفاده از مقادیر نهایی، شدت تغییرات بیوشیمیایی و متابولیکی طی فرآیند تخمیر مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مدل، درصد تغییرات اسیدیته، درصد تغییرات pH و درصد تغییرات فولات خمیرترش به‌عنوان متغیرهای مستقل وارد مدل شدند و معادله زیر حاصل گردید:

$$\text{Bread Folate}=61.02+0.18(\%\Delta\text{Acidity})-1.9984(\%\Delta\text{pH})-0.0661(\%\Delta\text{Sourdough Folate})$$

مدل دوم دارای مقدار R^2 برابر با ۸۶/۳۸ درصد بود. با این حال، با توجه به تعداد بسیار محدود مشاهدات، این مقدار صرفاً بیانگر برازش مدل بر داده‌های موجود است و نباید به‌عنوان شاخصی از قدرت پیش‌بینی یا قابلیت تعمیم مدل تلقی شود. مقدار بالاتر R^2 مشاهده‌شده در مدل دوم نشان‌دهنده برازش بیشتر این مدل به داده‌های موجود است؛ با این حال، به‌دلیل محدود بودن تعداد مشاهدات و نبود اعتبارسنجی متقابل، این یافته نباید به‌عنوان برتری مدل از نظر قابلیت پیش‌بینی یا تعمیم‌پذیری تفسیر شود. این یافته نشان می‌دهد که متغیرهای دینامیکی تخمیر در مجموعه داده حاضر اطلاعات بیشتری درباره الگوی تغییرات فولات نسبت به متغیرهای نهایی فراهم کرده‌اند. در این مدل، درصد افزایش اسیدیته با مقادیر بالاتر فولات نهایی نان همراه بود، اما این ارتباط صرفاً در چارچوب مدل اکتشافی حاضر قابل تفسیر است و نباید به‌عنوان رابطه علت و معلولی در نظر گرفته شود.

این موضوع نشان می‌دهد هرچه شدت فرآیند اسیدی شدن بیشتر باشد، میزان سنتز و تجمع فولات نیز افزایش می‌یابد. این موضوع احتمالاً ناشی از فعالیت بیشتر باکتری‌های اسید لاکتیک و تعامل متابولیکی میان LABها و مخمر در طی فرآیند تخمیر است. از سوی دیگر، درصد تغییرات pH دارای اثر منفی بود که این موضوع با نتایج حاصل از PCA و رفتار کلی سیستم تخمیر کاملاً همخوانی داشت. کاهش pH طی تخمیر نشان‌دهنده شدت بیشتر فعالیت میکروبی و تولید اسیدهای آلی است که در نهایت می‌تواند موجب افزایش تولید فولات گردد. نتایج مدل دوم نشان داد که در مجموعه داده حاضر، متغیرهای مبتنی بر تغییرات دینامیکی تخمیر توصیف بهتری از تغییرات مشاهده‌شده نسبت به متغیرهای نهایی ارائه کردند. این یافته از دیدگاه بیوشیمیایی بسیار حائز اهمیت است، زیرا نشان می‌دهد که فرآیند غنی‌سازی زیستی فولات یک پدیده پویا و وابسته به شدت تحولات متابولیکی است و نمی‌توان آن را صرفاً بر اساس شرایط نهایی سیستم توصیف کرد. به عبارت دیگر، سرعت و شدت تغییرات ایجادشده در طی تخمیر، نقش تعیین‌کننده‌ای در تجمع فولات و حفظ آن در محصول نهایی ایفا می‌کنند.

مقایسه دو مدل نشان داد که مدل مبتنی بر تغییرات دینامیکی تخمیر در داده‌های حاضر برازش بیشتری نسبت به مدل مبتنی بر مقادیر نهایی داشت. با این حال، به‌دلیل محدودیت تعداد تیمارها و نبود

اعتبارسنجی متقابل، امکان نتیجه‌گیری درباره برتری پیش‌بینی هیچ‌یک از دو مدل وجود ندارد و این نتایج صرفاً در سطح اکتشافی قابل تفسیر هستند.

به‌طور کلی، تحلیل PLSR در این مطالعه صرفاً به‌عنوان یک تحلیل اکتشافی انجام شد و الگوهای ارتباطی مشاهده‌شده در آن با روندهای کلی حاصل از PCA همخوانی داشتند. با این حال، به‌دلیل تعداد بسیار محدود نمونه‌ها، این نتایج نباید به‌عنوان شواهدی برای روابط علت و معلولی، عوامل تعیین‌کننده فولات یا یک مدل پیش‌بینی‌کننده قابل تعمیم تفسیر شوند. مطالعات آینده با تعداد بیشتری از تیمارها و نمونه‌ها و استفاده از اعتبارسنجی مستقل می‌توانند برای بررسی و تأیید روابط مشاهده‌شده مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده همزمان از باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده فولات و مخمر در سیستم خمیرترش گندم، می‌تواند به‌طور معنی‌داری موجب افزایش محتوای فولات در خمیر و نان نهایی شود. در میان تیمارهای مورد بررسی، نمونه نان B1 حاصل از خمیرترش S1 (حاوی مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب) بیشترین میزان فولات و کمترین میزان افت فولات طی فرآیند پخت را نشان داد که بیانگر عملکرد مطلوب این ترکیب آغازگر در حفظ مقدار بیشتری از فولات در محصول نهایی است. نتایج تحلیل PCA نشان داد که متغیرهای فیزیکوشیمیایی مورد بررسی، به‌ویژه pH، اسیدیته و فولات، سهم قابل‌توجهی در تفکیک تیمارها و توصیف الگوی تغییرات سیستم تخمیر داشتند. همچنین، تحلیل PLSR به‌عنوان یک ابزار کمومتریک اکتشافی، به شناسایی متغیرهای مؤثر بر تغییرات فولات نهایی نان و بررسی روابط چندمتغیره میان ویژگی‌های خمیرترش و محصول نهایی کمک کرد. در مجموع، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که طراحی ترکیب مناسب از مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده فولات، می‌تواند راهبردی مؤثر برای افزایش زیست‌غنی‌سازی فولات در نان‌های خمیرترش باشد. با این حال، با توجه به تعداد محدود تیمارهای مورد بررسی، انجام مطالعات آینده با حجم نمونه بیشتر و اعتبارسنجی مستقل مدل‌های کمومتریک، برای تأیید و تعمیم این یافته‌ها ضروری است.

منابع تأمین مالی

مقاله حاضر مستخرج از رساله دکتری و بخشی از طرح شماره ۳ (رساله دکتری) مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد استخراج شده است. نویسندگان مقاله، بدینوسیله مراتب تقدیر و سپاس خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد، به خاطر حمایت مالی از طرح شماره ۳ (شماره گرنت ۶۴۱۱۹) ابراز می‌دارد. مقاله حاصل رساله به شماره ثبت ۳/۶۴۱۱۹ و تاریخ ثبت ۱۴۰۴/۱/۳۱ محل ثبت مشهد و تأمین‌کننده منابع مالی دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. همچنین مراتب تشکر صمیمانه از کلیه کسانی که در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش یاری نمودند، اعلام می‌دارند.

میزان مشارکت نویسندگان

سعید افضلی: مواد و روش‌های پژوهش و انجام آزمایشات، **محمد رضا عدالتیان دوم:** مفهوم‌سازی، نظارت، منابع، تأمین مالی، مدیریت پروژه، تحقیق و بررسی، نرم‌افزار، تحلیل رسمی، اعتبارسنجی، بررسی و یرایش مقاله. **محمد باقر حبیبی نجفی:** نظارت و بررسی و ویرایش مقاله. **علی مقیمی:** کمک و مشاوره در بخش آزمایشات و بررسی و مرور مقاله. **امیر پورفرزاد:** مشاوره در بخش آماری و مطالعات کمومتریک.

References

1. Albano, C., Silvetti, T., & Brasca, M. (2020). Screening of lactic acid bacteria producing folate and their potential use as adjunct cultures for cheese bio-enrichment. *FEMS Microbiology Letters*, *367*(9). https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa059
2. Arcot, J., Wootton, M., Alury, S., Chan, H.Y., & Shrestha, A.K. (2002). Folate levels in twelve Australian wheats and changes during processing into bread. *Food Australia*, *54*(1), 18-20.
3. Banu, I., Vasilean, I., & Aprodu, I. (2011). Effect of select parameters of the sourdough rye fermentation on the activity of some mixed starter cultures. *Food Biotechnology*, *25*(4), 275-291. https://doi.org/10.1080/08905436.2011.617251
4. Butterfield, S., & Calloway, D.H. (1972). Folacin in wheat and selected foods1. *Journal of the American Dietetic Association*, *60*(4), 310-314. https://doi.org/10.1016/S0002-8223(21)15037-0
5. Clarke, C.I., & Arendt, E.K. (2005). A review of the application of sourdough technology to wheat breads. *Advances in Food and Nutrition Research*, *49*(1), 137-161.
6. Crittenden, R.G., Martinez, N.R., & Playne, M.J. (2003). Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *80*(3), 217-222. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00170-8

7. De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M., & Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiology*, *37*, 11-29. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002
8. Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., ... & Wick, L.Y. (2018). Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(3), 335-352. https://doi.org/10.1093/femsre/fuy008
9. Fraberger, V., Ladurner, M., Nemec, A., Grunwald-Gruber, C., Call, L.M., Hochegger, R., ... & D'Amico, S. (2020). Insights into the potential of sourdough-related lactic acid bacteria to degrade proteins in wheat. *Microorganisms*, *8*(11), 1689. https://doi.org/10.3390/microorganisms8111689
10. Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., & Sarniguet, A. (2011). Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *75*(4), 583-609. https://doi.org/10.1128/mmbr.00020-11
11. Furukawa, S., Watanabe, T., Toyama, H., & Morinaga, Y. (2013). Significance of microbial symbiotic coexistence in traditional fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *116*(5), 533-539. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.017
12. Greppi, A., Hemery, Y., Berrazaga, I., Almaksour, Z., & Humblot, C. (2017). Ability of lactobacilli isolated from traditional cereal-based fermented food to produce folate in culture media under different growth conditions. *Lwt*, *86*, 277-284. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.007
13. Gujska, E., & Majewska, K. (2005). Effect of baking process on added folic acid and endogenous folates stability in wheat and rye breads. *Plant Foods for Human Nutrition*, *60*(2), 37-42. https://doi.org/10.1007/s11130-005-5097-0
14. Gül, H., Özçelik, S., Sağdıç, O., & Certel, M. (2005). Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochemistry*, *40*(2), 691-697. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.044
15. Hanson, A.D., Gage, D.A., & Shachar-Hill, Y. (2000). Plant one-carbon metabolism and its engineering. *Trends in Plant Science*, *5*(5), 206-213. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01599-5
16. Hjortmo, S., Patring, J., Jastrebova, J., & Andlid, T. (2008). Biofortification of folates in white wheat bread by selection of yeast strain and process. *International Journal of Food Microbiology*, *127*(1-2), 32-36. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.001
17. Hosseini, F., Habibi Najafi, M.B., & Edalatian Dovom, M.R. (2024). Screening of lactic acid bacteria for highly producing extra and intracellular folate and their potential use in production of bio-enriched yogurt. *LWT*, *209*, 116766. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116766
18. Hu, L., Li, Y., Huang, X., Du, C., Huang, D., & Tao, X. (2023). The effect of co-fermentation with *Lactobacillus plantarum* HLJ29L2 and yeast on wheat protein characteristics in sourdough and crackers. *Foods*, *12*(3), 555. https://doi.org/10.3390/foods12030555
19. Kariluoto, S., Vahteristo, L., Salovaara, H., Katina, K., Liukkonen, K.H., & Piironen, V. (2004). Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. *Cereal Chemistry*, *81*(1), 134-139. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.1.134
20. Katina, K. (2005). *Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread* (Doctoral dissertation, Helsingin yliopisto).
21. Keagy, P.M., Stokstad, E.L.R., & Fellers, D.A. (1975). Folacin stability during bread processing and family flour storage. *Cereal Chemistry*, *52*, 349-356.
22. Korcari, D., Ricci, G., Quattrini, M., & Fortina, M.G. (2020). Microbial consortia involved in fermented spelt sourdoughs: Dynamics and characterization of yeasts and lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, *70*(1), 48-54. https://doi.org/10.1111/lam.13241
23. Laiño, J.E., del Valle, M.J., de Giori, G.S., & 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), 1-5. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.035
24. Laiño, J.E., LeBlanc, J.G., & Savoy de Giori, G. (2012). Production of natural folates by lactic acid bacteria starter cultures isolated from artisanal Argentinean yogurts. *Canadian Journal of Microbiology*, *58*(5), 581-588 https://doi.org/10.1139/w2012-026
25. Lamers, Y., Prinz-Langenohl, R., Brämswig, S., & Pietrzik, K. (2006). Red blood cell folate concentrations increase more after supplementation with [6 S]-5-methyltetrahydrofolate than with folic acid in women of childbearing age. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(1), 156-161.
26. Li, J., Duan, H., Ramaswamy, H., & Wang, C. (2025). A comprehensive review of fortification, bioavailability, and health benefits of folate. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(16), 7703. https://doi.org/10.3390/ijms26167703

27. Liu, F., Edelmann, M., Piironen, V., & Kariluoto, S. (2022). 5-Methyltetrahydrofolate is a crucial factor in determining the bioaccessibility of folate in bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *70*(41), 13379. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03861
28. Liu, F., Kariluoto, S., Edelmann, M., & Piironen, V. (2021). Bioaccessibility of folate in faba bean, oat, rye and wheat matrices. *Food Chemistry*, *350*, 129259. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129259
29. Lopez, H.W., Krespine, V., Guy, C., Messager, A., Demigne, C., & Remesy, C. (2001). Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(5), 2657-2662. https://doi.org/10.1021/jf001255z
30. Maruvada, P., Stover, P.J., Mason, J.B., Bailey, R.L., Davis, C.D., Field, M.S., ... & Zappalà, G. (2020). Knowledge gaps in understanding the metabolic and clinical effects of excess folates/folic acid: a summary, and perspectives, from an NIH workshop. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *112*(5), 1390-1403. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa259
31. Smith, A.D. (2007). Folic acid fortification: the good, the bad, and the puzzle of vitamin B-12. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(1), 3-5.
32. Mendes Ferreira, A., & Mendes-Faia, A. (2020). The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking. *Foods*, *9*(9), 1231. https://doi.org/10.3390/foods9091231
33. Michel, E., Masson, E., Bubbendorf, S., Lapicque, L., Nidelet, T., Segond, D., ... & participating bakers. (2019). Artisanal and farmers bread-making practices differently shape fungal species community composition in French sourdoughs. *BioRxiv*, 679472. https://doi.org/10.1101/679472
34. Miller, J.W., & Ulrich, C.M. (2013). Folic acid and cancer—where are we today?. *The Lancet*, *381*(9871), 974-976. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *87*, 517-533. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60110-5
35. Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G., ... & Gobbetti, M. (2012). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(4), 1251-1264. https://doi.org/10.1128/AEM.07721-11
36. Moazzen, S., Dastgiri, S., Dolatkhah, R., Alizadeh, B.Z., & de Bock, G.H. (2021). Staple food fortification with folic acid and iron and gastrointestinal cancers: critical appraisal of long-term national fortification. *Nutrition and Cancer*, *73*(8), 1534-1538. https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1801778
37. Osseyi, E.S., Wehling, R.L., & Albrecht, J.A. (2001). HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. *Cereal Chemistry*, *78*(4), 375-378. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2001.78.4.375
38. Ö hrvik, V., Lemming, E.W., Nälsén, C., Becker, W., Ridefelt, P., & Lindroos, A.K. (2018). Dietary intake and biomarker status of folate in Swedish adults. *European Journal of Nutrition*, *57*(2), 451–462. https://doi.org/10.1007/s00394-016-1328-4
39. Patring, J.D., Jastrebova, J.A., Hjortmo, S.B., Andlid, T.A., & Jägerstad, I.M. (2005). 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*, *53*(7), 2406-2411. https://doi.org/10.1021/jf048083g
40. Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D., & Rossi, M. (2007). Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(1), 179-185. https://doi.org/10.1128/AEM.01763-06
41. Rao, D.R., Reddy, A.V., Pulusani, S.R., & 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), 1169-1174. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81419-8
42. Riaz, B., Liang, Q., Wan, X., Wang, K., Zhang, C., & Ye, X. (2019). Folate content analysis of wheat cultivars developed in the North China Plain. *Food Chemistry*, *289*, 377-383. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.028
43. Rossi, M., Amaretti, A., & Raimondi, S. (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients*, *3*(1), 118-134. https://doi.org/10.3390/nu3010118
44. Saini, R.K., Nile, S.H., & Keum, Y.S. (2016). Folates: Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability. *Food Research International*, *89*, 1-13. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.013
45. Saubade, F., Hemery, Y.M., Guyot, J.P., & Humblot, C. (2017). Lactic acid fermentation as a tool for increasing the folate content of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(18), 3894-3910. https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1192986
46. Senne de Oliveira Lino, F., Bajic, D., Vila, J.C.C., Sánchez, A., & Sommer, M.O.A. (2021). Complex yeast–bacteria interactions affect the yield of industrial ethanol fermentation. *Nature Communications*, *12*(1), 1498. Article number: 1498 (2021)

47. Sun, X., Wu, S., Li, W., Koksel, F., Du, Y., Sun, L., ... & Pei, F. (2023). The effects of cooperative fermentation by yeast and lactic acid bacteria on the dough rheology, retention and stabilization of gas cells in a whole wheat flour dough system–A review. *Food Hydrocolloids*, *135*, 108212. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108212
48. Van Kerrebroeck, S., Maes, D., & De Vuyst, L. (2017). Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. *Trends in Food Science & Technology*, *68*, 152-159. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.016
49. Viesser, J.A., de Melo Pereira, G.V., de Carvalho Neto, D.P., Rogez, H., Góes-Neto, A., Azevedo, V., ... & Soccol, C.R. (2021). Co-culturing fructophilic lactic acid bacteria and yeast enhanced sugar metabolism and aroma formation during cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *339*, 109015. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109015
50. Vogel, R.F., Knorr, R., Müller, M.R., Steudel, U., Gänzle, M.G., & Ehrmann, M.A. (1999). Non-dairy lactic fermentations: The cereal world. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *76*, 403–411. https://doi.org/10.1023/A:1002089515177
51. Wagner, S.C. (2005). From starter to finish: Producing sourdough breads to illustrate the use of industrial microorganisms. *The American Biology Teacher*, *67*(2), 96-101. https://doi.org/10.1662/0002-7685(2005)067[0096:FSTFPS]2.0.CO;2
52. Wald, N., Sneddon, J., Densem, J., Frost, C., & Stone, R. (1991). Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet*, *338*(8760), 131-137. 7/20/91, 7 charts, 1 graph.
53. Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., ... & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in* B*ioengineering and* B*iotechnology*, *9*, 612285. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285
54. Wang, Y., Zhang, C., Liu, F., Jin, Z., & Xia, X. (2023). Ecological succession and functional characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *63*(22), 5841-5855. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2025035
55. Wang, Z., & Wang, L. (2024). Impact of sourdough fermentation on nutrient transformations in cereal-based foods: Mechanisms, practical applications, and health implications. *Grain & Oil Science and Technology*, *7*(2), 124-132. https://doi.org/10.1016/j.gaost.2024.03.001
56. Xu, Z., Lu, Z., Soteyome, T., Ye, Y., Huang, T., Liu, J., ... & Peters, B. M. (2021). Polymicrobial interaction between *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae*: coexistence-relevant mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*, *47*(3), 386-396. https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1893265
57. Zheng, J., Wang, X., Wu, B., Qiao, L., Zhao, J., Pourkheirandish, M., ... & Zheng, X. (2022). Folate (vitamin B9) content analysis in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Nutrition*, *9*, 933358. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.933358