

بهینه سازی تولید گامانونا لاکتون توسط لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس در خمیر ترش با روش ریز استخراج فاز جامد در فضای فوقانی

الهام فرهنگ^۱، سیدهادی رضوی^۲، سید سعید محتسبی^۳

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ایران پست الکترونیکی: srazavi@ut.ac.ir
۳- استاد گروه مکانیک ماشین های کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۴

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از خمیر ترش یک روش مناسب برای تولید عطر و طعم طبیعی در نان است. گامانونا لاکتون یکی از ترکیبات فرار مولد عطر میوه ای است. هدف مطالعه حاضر بررسی توانایی لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس برای تولید گامانونا لاکتون در خمیر ترش و همچنین بررسی شرایط بهینه برای تولید آن است.

مواد و روش ها: در این مطالعه برای تهیه خمیر ترش از مخلوط آردهای چاودار و جو به همراه سبوس گندم و سوربیتول استفاده شد. تخمیر توسط لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس ATCC ۴۳۳۲ انجام شد. آزمایش ها با روش سطح پاسخ با ۵ فاکتور طراحی شدند که شامل: زمان، دما، راندمان خمیر، درصد سوربیتول و درصد سبوس بود. استخراج ترکیبات فرار خمیر ترش با روش ریز استخراج فاز جامد از فضای فوقانی انجام شد و ترکیبات فرار استخراج شده توسط کروماتوگرافی گازی آنالیز شد.

یافته ها: تأثیر هر یک از عوامل بر میزان تولید گامانونا لاکتون با روش طراحی مرکب مرکزی مدل سازی شد. نتایج نشان داد که خمیر ترش با افزودن ۲۰٪ سبوس گندم و ۶٪ قند سوربیتول، با راندمان خمیر ۴۰٪ که به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ °C تخمیر شود، بهترین شرایط برای تولید گامانونا لاکتون است (۲۶/۳ ppm).

نتیجه گیری: در این مطالعه توانایی لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس برای تولید ترکیبات فرار مطلوب مثل گامانونا لاکتون با عطر میوه ای در خمیر ترش اثبات شد. دستاورد این مطالعه می تواند منجر به تولید نان حاوی خمیر ترش با عطر مطلوب گردد که موجب تشویق مصرف کنندگان برای مصرف نان سالم حاوی خمیر ترش و عاری از افزودنی شیمیایی می گردد.

واژگان کلیدی: خمیر ترش، عطر و طعم، کروماتوگرافی گازی، ریز استخراج فاز جامد فضای فوقانی، گامانونا لاکتون

• مقدمه

در اثر فعالیت میکروبی در طی تخمیر ایجاد می شود و تنها ناشی از اسیدی شدن شیمیایی نیست (۳). یکی از مهم ترین ویژگی های مؤثر بر مطلوبیت و قابلیت پذیرش محصول برای مصرف کننده، عطر و طعم آن است. با استفاده از خمیر ترش بهبود عطر و طعم بدون استفاده از مواد شیمیایی یا گران قیمت طبیعی امکان پذیر است.

توانایی میکروارگانیسم ها در رها سازی ترکیبات معطر برای اولین بار در سال ۱۹۲۳ کشف شد (۴). میزان و نوع ترکیبات فرار بستگی به سویه تخمیر کننده و شرایط تخمیر دارد. کمیت و کیفیت ترکیبات فرار تولید شده به بسیاری از

خمیر ترش مخلوطی از آرد و آب است که با استفاده از مخمر و/یا باکتری های لاکتیک اسید تخمیر می شود. البته علاوه بر آرد و آب، برخی عناصر اضافی مانند قند یا آنزیم برای تقویت تخمیر می توانند اضافه شوند (۱).

استفاده از لاکتیک اسید باکتری ها در محصولات غلات و فریزی تاریخچه طولانی دارد. نان حاوی خمیر ترش دارای عطر و طعم منحصر به فرد، ارزش غذایی بالا و ماندگاری طولانی و خصوصیات مطلوب تکنولوژیکی است (۲). استفاده از خمیر ترش در نان، اثرات مفیدی بر عطر و طعم، بافت، ماندگاری میکروبی و تاخیر در بیاتی دارد. بهبود عطر و طعم

مطالعه حاضر با هدف تولید یک خمیر ترش با عطر مطلوب انجام گرفته است. بدین منظور لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس به عنوان یکی از رایج ترین سویه های تخمیر کننده در تولید خمیر ترش انتخاب شد. در قدم اول توانایی تولید گامانونا لاکتون توسط این سویه اثبات می شود و برای نخستین بار تولید خمیر ترش با عطر مطلوب بهینه سازی می گردد.

دستاوردهای این مطالعه می تواند منجر به تولید نان حاوی خمیر ترش با عطر مطلوب گردد که موجب تشویق مصرف کنندگان برای مصرف نان سالم حاوی خمیر ترش و عاری از افزودنی های شیمیایی می گردد.

• مواد و روش ها

مواد: آردهای جو و چاودار از بازارهای محلی تهیه شدند که به ترتیب حاوی ۹/۸ و ۱۲٪ پروتئین؛ ۳/۶ و ۲/۳٪ چربی؛ ۲/۲ و ۳/۶٪ خاکستر بودند. لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس ATCC ۴۳۳۲ به صورت کشت فعال از مرکز ذخایر بیولوژیکی ایران (Iranian Biological Resource Center) IBRC تهیه گردید. محیط کشت MRS مایع از شرکت ایبرسکو (Ibresco) تهیه شد.

سیوس گندم (اندازه ذرات $500 \mu\text{m}$) از شرکت نان آوران سیوس تهیه شد. همچنین سوربیتول با درجه آزمایشگاهی از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich Co., USA) خریداری شد.

تهیه خمیر ترش: برای تهیه خمیر ترش آردهای جو و چاودار به نسبت مساوی تا رسیدن به غلظت یا راندمان خمیر DY (Dough Yield) مورد نظر مخلوط شدند. راندمان خمیر با صد برابر نسبت وزن خمیر به وزن آرد به دست می آید. لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس برای مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C در محیط کشت MRS کشت داده شد. غلظت 10^7 cfu/ml به عنوان غلظت اولیه برای تلقیح در نظر گرفته شد. برای رسیدن به دانسیته سلولی ثابت به ازای هر 100 میلی لیتر از خمیر ترش 20 میلی لیتر از محیط MRS کشت داده شده استفاده شد. (هر میلی لیتر از محیط کشت داده شده حاوی $25 \times 10^7 \text{ cfu}$ است). محیط کشت حاوی سلولها به مدت 10 دقیقه با سرعت 4000 دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. جرم سلولی جدا شده دوبار توسط سرم فیزیولوژیکی استریل شسته و سپس به مخلوط آردها و آب اضافه شد. سپس این مخلوط در دما و زمان تعیین شده (مطابق طرح آماری) برای تکمیل فرایند تخمیر در انکوباتور قرار گرفت.

عوامل فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی بستگی دارد مثل: دمای تخمیر، زمان، pH، هوا دهی، طبیعت منابع کربن و نیتروژن، دسترس پذیری و غلظت مواد مغذی (۷-۵).

لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس یکی از مهم ترین باکتری های جدا سازی شده از خمیر ترش های چاودار و گندم است. این باکتری به دلیل توانایی اسیدی کردن و رهاسازی پیش سازهای ترکیبات فرار، می تواند تأثیر بسیار مهمی بر خصوصیات بافتی و عطر و طعم خمیر داشته باشد (۸، ۹). به علاوه؛ سیستم تجزیه پروتئین (۱۰)، کاتابولیسیم اسیدهای آمینه خاص (۱۱، ۱۲) فعالیت آنزیم های بتا گلوکوزیداز و مانیتول دهیدروژناز (۱۳، ۱۲) و همچنین تولید اگزوپلی ساکاریدها (۱۴) در برخی سویه های لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس مطالعه شده است.

در این مطالعه به بررسی ترکیبات فرار تولید شده توسط لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس در جریان تخمیر می پردازیم. یکی از ترکیبات مطلوب تولید شده توسط این سویه، گامانونا لاکتون است. گاما نونا لاکتون، یک لاکتون با بوی شبیه نارگیل یا هلو است. لاکتون ها می توانند از طریق هیدروکسیلاسیون و بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد (مثل اولئیک اسید و لینولئیک اسید) در طی تخمیر تشکیل شوند (۱۵، ۱۶). لاکتیک اسید باکتری ها می توانند این اسیدهای چرب آزاد را تولید کنند که به عنوان پیش ساز برای بسیاری از ترکیبات معطر و لاکتون ها مورد استفاده قرار می گیرد. ترکیبات فرار از طریق اتواکسیداسیون لینولئیک اسید تولید می شوند. این فرایند منجر به تولید هگزانال می شود. در مراحل بعدی آلدئید دهیدروژناز و الکل دهیدروژناز به ترتیب در تشکیل هگزانولئیک اسید و هگزانول شرکت می کنند (۱۷).

یکی از بهترین روش ها برای استخراج ترکیبات فرار استفاده از روش های بدون حلال مانند روش ریز استخراج از فضای فوقانی (Head space) است. این روش زمان کمتری نسبت به سایر روش ها می گیرد و فرایند آسانی است، همچنین مشکل تشکیل محصولات مصنوعی نیز حداقل است زیرا از دماهای بالا و حلال های آلی استفاده نمی شود. به علاوه، از تلفات در طول استخراج، جداسازی و تغلیظ ترکیبات معطر اجتناب می شود. با این وجود، روش فضای فوقانی نیز مشکلاتی دارد زیرا ترکیبات استخراج شده فقط شامل ترکیبات فراوان و بسیار فرار هستند. ریز استخراج فاز جامد از فضای فوقانی (HS-SPME - Solid Phase Micro Extraction) امروزه بهترین انتخاب برای تجزیه و تحلیل ترکیبات معطر نان است (۱۸، ۱۹، ۱).

استخراج ترکیبات فرار با روش ریز استخراج فاز جامد از فضای فوقانی HS-SPME: استخراج ترکیبات فرار توسط روش ریز استخراج فاز جامد فضای فوقانی HS-SPME انجام شد. برای اجرای این تکنیک از یک فیبر SPME (DVB/Carboxen/PDMS Stable Flex) که از شرکت ساپلکو (Bellefonte, PA, USA) خریداری شده بود، استفاده شد. قبل از جذب ترکیبات فرار توسط فیبر، برای حذف آلودگی‌های احتمالی از فیبر، طبق دستورالعمل تولید کننده ابتدا فیبر در بخش تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی قرار داده شد. جهت آنالیز ۲ گرم (± 0.0010 گرم) از هر نمونه در داخل ویال ۲۰ میلی لیتری وزن شد و سپس ۶ میلی لیتر از محلول حجمی/وزنی ۱۵٪ NaCl برای افزایش فراریت افزوده شد. پس از دربندی در یک حمام آب با دمای 50°C بر روی یک همزن مغناطیسی قرار گرفت و سپس فیبر از طریق سوراخ کوچکی وارد ویال شد و پس از ۳۰ دقیقه متعادل شدن ترکیبات فرار در فضای فوقانی، فیبر خارج و فوراً به صورت دستی در محل تزریق کروماتوگرافی گازی قرار گرفت تا واجذب حرارتی صورت بگیرد.

طرح آزمایشات: به منظور بررسی تأثیر عوامل مختلف در تولید عطر میوه‌ای در خمیر ترش، میزان گامانونالاکتون (بر اساس سطح کروماتوگرام) به عنوان متغیر وابسته (پاسخ) در نظر گرفته شد. تأثیر ۵ فاکتور در ۲ سطح با ۱۶ تکرار در نقطه مرکزی به نحوی که $\alpha=1$ بود بررسی شد. بنابراین طرح مرکب مرکزی از نوع CCF (face-centered) اجرا شد و طرح آزمایش‌ها با ۹۰ آزمایش برنامه‌ریزی شد. در این طراحی دما (25°C ، 37°C)، زمان تخمیر (۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت)، راندمان خمیر (۲۰۰، ۴۰۰)، درصد سوربیتول (۲٪، ۶٪) و درصد سبوس (۱۰٪، ۲۰٪) به عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند. حدود مورد استفاده برای شاخص‌های بهینه‌سازی در جدول ۱ آورده شده است. لازم به ذکر است میزان درصد سبوس گندم و قند سوربیتول بر مبنای وزن آرد مورد استفاده در فرمولاسیون است.

جدول ۱. محدوده‌های در نظر گرفته شده برای بهینه‌سازی

شاخص	حد پایین	حد بالا
A=زمان(ساعت)	۲۴	۷۲
B=دما($^{\circ}\text{C}$)	۲۵	۳۷
C=راندمان خمیر	۲۰۰	۴۰۰
D=سوربیتول(درصد)	۲	۶
E=سبوس(درصد)	۱۰	۲۰
گامانونالاکتون	$10^6 \times 2/11339$	$10^7 \times 3/39611$

بعد از آنالیز نمودن رگرسیون، مدل درجه دوم برای پاسخ ارائه شد. همچنین برای نشان دادن ارتباط بین متغیر وابسته با متغیرهای مستقل نمودار سطوح آنها توسط نرم افزار مورد استفاده ترسیم شد. جهت ارزیابی مدل؛ ضریب تغییرات (CV)، ضریب تبیین R^2 ، R^2 ، Adj، R^2 ، press و کفایت دقت (Adeq-precision) مدل محاسبه شدند (جدول ۲).

آنالیز ترکیبات فرار به روش GC-MS: ترکیبات فرار استخراج شده با فیبر SPME توسط دستگاه کروماتوگراف گازی (Hewlett Packard ۶۸۵۰) که متصل به یک شناساگر جرمی (Agilent Technologies ۵۹۷۳) است انجام شد. جداسازی ترکیبات فرار توسط ستون (StabilWAX-DA) انجام شد (۳۰ متر \times ۳۲/۰ میلی متر با ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر). گاز هلیوم (دمای اولیه 25°C ، فشار ۴۷/۸ Kpa، شدت جریان ۵۰ ml/min) به عنوان گاز حامل انتخاب شد. برنامه دمایی به صورت زیر تنظیم شد: دمای اولیه 40°C برای ۵ دقیقه نگه داشته شد و سپس با نرخ 5°C در دقیقه تا دمای 260°C رسید و در دمای نهایی ۳ دقیقه نگه داشته شد. دمای قسمت تزریق کننده 250°C تنظیم شد تا ترکیبات فرار جذب شده در فیبر SPME واجذب شوند. محدوده ۴۰ تا ۴۰۰ amu با پتانسیل یونیزاسیون ۷۰ eV برای اسکن انتخاب شد. برای شناسایی ترکیبات از کتابخانه مرجع (NIST14) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده از اجرای کروماتوگرافی از نرم‌افزار

جدول ۲. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر زمان، دما، راندمان خمیر، درصد سوربیتول و سیوس گندم بر روی میزان گامانونا لاکتون

منابع	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F-value	p-value
مدل	۲۰	$2/848 \times 10^{15}$	$1/424 \times 10^{14}$	۲۹/۲۹	< ۰/۰۰۰۱
زمان-A	۱	$5/008 \times 10^{14}$	$5/008 \times 10^{14}$	۱۰۳/۰۱	< ۰/۰۰۰۱
دما-B	۱	$1/150 \times 10^{15}$	$1/150 \times 10^{15}$	۲۳۶/۴۶	< ۰/۰۰۰۱
راندمان خمیر-C	۱	$9/961 \times 10^{12}$	$9/961 \times 10^{12}$	۲/۰۵	۰/۱۵۶۸
سوربیتول-D	۱	$3/427 \times 10^{14}$	$3/427 \times 10^{14}$	۷۰/۴۹	< ۰/۰۰۰۱
سیوس-E	۱	$2/277 \times 10^{14}$	$2/277 \times 10^{14}$	۴۶/۸۲	< ۰/۰۰۰۱
AB	۱	$1/340 \times 10^{14}$	$1/340 \times 10^{14}$	۲۷/۵۶	< ۰/۰۰۰۱
AC	۱	$3/895 \times 10^{13}$	$3/895 \times 10^{13}$	۸/۰۱	۰/۰۰۶۱
AD	۱	$1/562 \times 10^{14}$	$1/562 \times 10^{14}$	۳۲/۱۳	< ۰/۰۰۰۱
AE	۱	$1/993 \times 10^{13}$	$1/993 \times 10^{13}$	۴/۱۰	۰/۰۴۶۸
BC	۱	$2/664 \times 10^{13}$	$2/664 \times 10^{13}$	۵/۴۸	۰/۰۲۲۱
BD	۱	$1/527 \times 10^{13}$	$1/527 \times 10^{13}$	۳/۱۶	۰/۰۷۹۸
BE	۱	$9/891 \times 10^{12}$	$9/891 \times 10^{12}$	۲/۰۳	۰/۱۵۸۳
CD	۱	$2/940 \times 10^{13}$	$2/940 \times 10^{13}$	۶/۰۵	۰/۰۱۶۵
CE	۱	$1/115 \times 10^{13}$	$1/115 \times 10^{13}$	۲/۲۹	۰/۱۳۴۵
DE	۱	$8/756 \times 10^{13}$	$8/756 \times 10^{13}$	۱۸/۰۱	< ۰/۰۰۰۱
A ²	۱	$5/340 \times 10^{11}$	$5/340 \times 10^{11}$	۰/۱۰۹۸	۰/۷۴۱۳
B ²	۱	$7/951 \times 10^{12}$	$7/951 \times 10^{12}$	۱/۶۴	۰/۲۰۵۳
C ²	۱	$4/469 \times 10^{12}$	$4/469 \times 10^{12}$	۰/۹۱۹۲	۰/۳۴۱۰
D ²	۱	$1/964 \times 10^9$	$1/964 \times 10^9$	۰/۰۰۰۴	۰/۹۸۴۰
E ²	۱	$1/059 \times 10^{13}$	$1/059 \times 10^{13}$	۲/۱۸	۰/۱۴۴۴
باقی مانده ها	۶۹	$3/355 \times 10^{14}$	$4/862 \times 10^{12}$		
عدم تطابق	۲۲	$1/454 \times 10^{14}$	$6/611 \times 10^{12}$	۱/۶۳	۰/۰۷۸۷
خطای خالص	۴۷	$1/900 \times 10^{14}$	$4/043 \times 10^{12}$		
کل	۸۹	$3/184 \times 10^{15}$			

* نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال ۵٪-

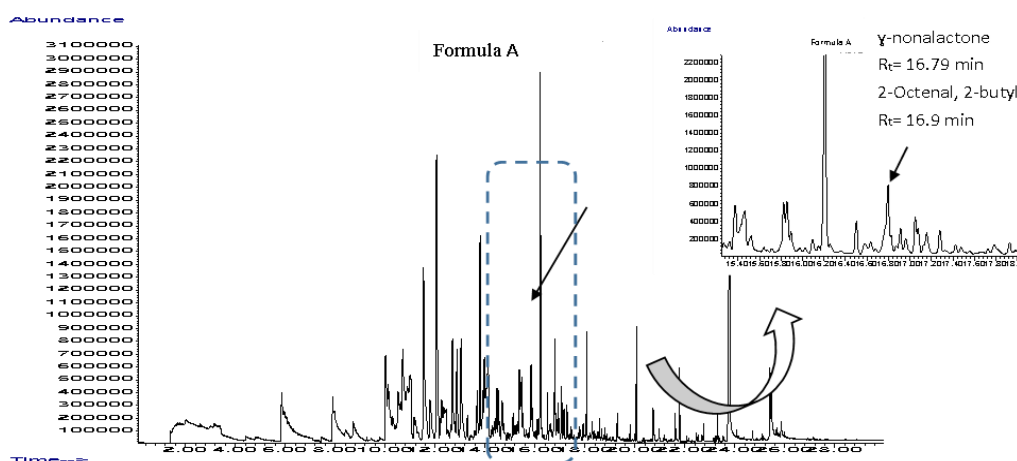
$$R^2 = 0/8946 \quad R^2_{Adj} = 0/8441 \quad cv\% = 17/80 \quad \text{Std.Dev} = 2/205 \times 10^6 \quad \text{PRESS} = 5/815 \times 10^{14} \quad \text{Adeq-Precision} = 0/073$$

• یافته‌ها

شناسایی ترکیبات فرار در خمیر ترش و انتخاب ترکیب هدف: در میان ترکیبات فرار شناسایی شده با روش SPME-GC، آلدئیدها، الکلها و اسیدها فراوانترین گروهها هستند که برخی از آنها مسئول ایجاد عطرهای مطلوب هستند به عنوان مثال ۲ و ۳ بوتان دیول (کره)، بنزآلدئید (بادام)، بنزن استالدهاید (عسل، شیرین)، فنیل اتیل الکل (رز)، نونانال (مرکبات)، دکانال (پوست پرتقال)، استیک اسید ۲- فنیل اتیل استر (عسل)، گاما نونالاکتون (هلو، نارگیل)، ۲- بوتیل ۲- اکتال (میوه‌ای، آناناس). جدول ۳ نشان دهنده طیف گسترده ترکیبات فرار موجود در فضای فوقانی خمیر ترش تخمیر شده توسط لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس است و به روشنی می‌تواند توانایی این سویه برای تولید ترکیبات فرار

مؤثر بر عطر و طعم را در محیط خمیر ترش نشان دهد (شکل ۱، جدول ۳).

هر چند درک نهایی از عطر و طعم یک محصول متأثر از مخلوط بسیار پیچیده‌ای از انواع ترکیبات فرار است و هرکدام به نوبه خود می‌توانند در ایجاد عطر نهایی مؤثر باشند اما میزان تأثیر یک ترکیب فرار بر عطر نهایی به غلظت و همچنین آستانه درک آن بستگی دارد. بنابراین ممکن است یک ترکیب با غلظت نه چندان بالا به دلیل آستانه درک پایین، تأثیر غیر قابل انکاری بر برآیند عطر محصول داشته باشد. از آنجا که عطر خمیر ترش تولید شده توسط ارزیابی حسی به صورت میوه‌ای توصیف شد؛ ترکیب گامانونا لاکتون به عنوان ترکیب هدف برای اجرای بهینه سازی انتخاب شد.



شکل ۱. طیف ترکیبات فرار خمیر ترش تخمیر شده توسط لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس توسط روش HS-SPME-GC

جدول ۳. لیست ترکیبات شناسایی شده به روش HS-SPME-GC در خمیر ترش.

زمان بازداری	ترکیب فرار شناسایی شده	زمان بازداری	ترکیب فرار شناسایی شده	زمان بازداری	ترکیب فرار شناسایی شده
۱۸/۵۲	۲-تریدکانون	۱۳/۰۷	فنیل اتیل الکل	۴/۲۴	استیک اسید
۱۸/۵۷	پنتادکان	۱۳/۷۹	۲-نانال، (E)	۵/۸۹	هگزانال
۱۸/۶۶	فنول، ۲،۴-بیس (۱،۱-دی متیل اتیل)	۱۴/۰۵	اکتانوئیک	۷/۹۲	۱- هگزانول
۱۹/۱۱	دیپیدروکتیدپولید	۱۴/۵۲	دکانال	۸/۷۶	هپتانال
۱۹/۲۸	دودکانوئیک اسید	۱۴/۶۸	۲،۴-نونادی انال، (E,E)	۹/۱۳	اکسامی-متوکسی-فنیل
۱۹/۸	هگزادکانون	۱۴/۸۱	گرانیل وینیل اتر	۱۰/۰۲	۲- هپتانال
۱۹/۹	تترادکانال	۱۵/۰۷	فنیل - پروپان دیوئیک اسید	۱۰/۳۲	۱- هپتانول
۲۱/۵۹	تترادکانوئیک اسید	۱۵/۲۷	۲-فنیل اتیل هگزانوات	۱۰/۵۳	۱- اکتان-۳-ال
۲۲/۰۷	نونادکان	۱۴/۶۸	۲،۴-نونادی انال- (E,E)	۱۰/۷۲	فوران، ۲- پنتیل
۲۲/۵۲	فیتون	۱۵/۰۷	فنیل مالونیک اسید	۱۰/۸۸	هگزانوئیک اسید
۲۲/۷۶	بوتیل اکتیل فتالات	۱۵/۱۸	هموفتالیک اسید	۱۰/۹۸	اکتانال
۲۳/۱۳	نونادکان	۱۵/۲۶	۲- فنیل اتیل استات	۱۱/۲۲	بنزن، ۱،۴-دی کلرو
۲۳/۳۸	متیل پالمیتات	۱۵/۳۹	نونانوئیک اسید	۱۱/۵۹	۵-اتیل سیکلوینت-۱-ان کربوکسالدیاید
۲۳/۷۴	۱۱-هگزادکانوئیک اسید	۱۵/۸۵	۲،۴-دکادی انال- (E,E)	۱۱/۸۱	بنزن استالدیاید
۲۴/۰۶	اتیل پالمیتات	۱۶/۷۹	گامانوناکتون	۱۲/۰۶	۲-اکتانال، (E)
۲۵/۳۹	۹،۱۲-اکتادکانوئیک اسید (Z,Z)	۱۶/۹	۲-اکتانال، ۲- بوتیل	۱۲/۴۴	هپتانوئیک اسید
۲۵/۴۴	اولئیک	۱۷/۰۷	بتا-داماسنون	۱۲/۸۸	نونانال
۲۵/۸۶	فنول- (1-4,4'-متیل اتیلیدن) بیس	۱۷/۲۷	تترادکان	۱۳/۰۲	فنیل اتیل الکل
		۱۷/۹۲	نریل استون	۱۳/۱۲	بنزن، ۱،۲،۴،۵-تترامتیل

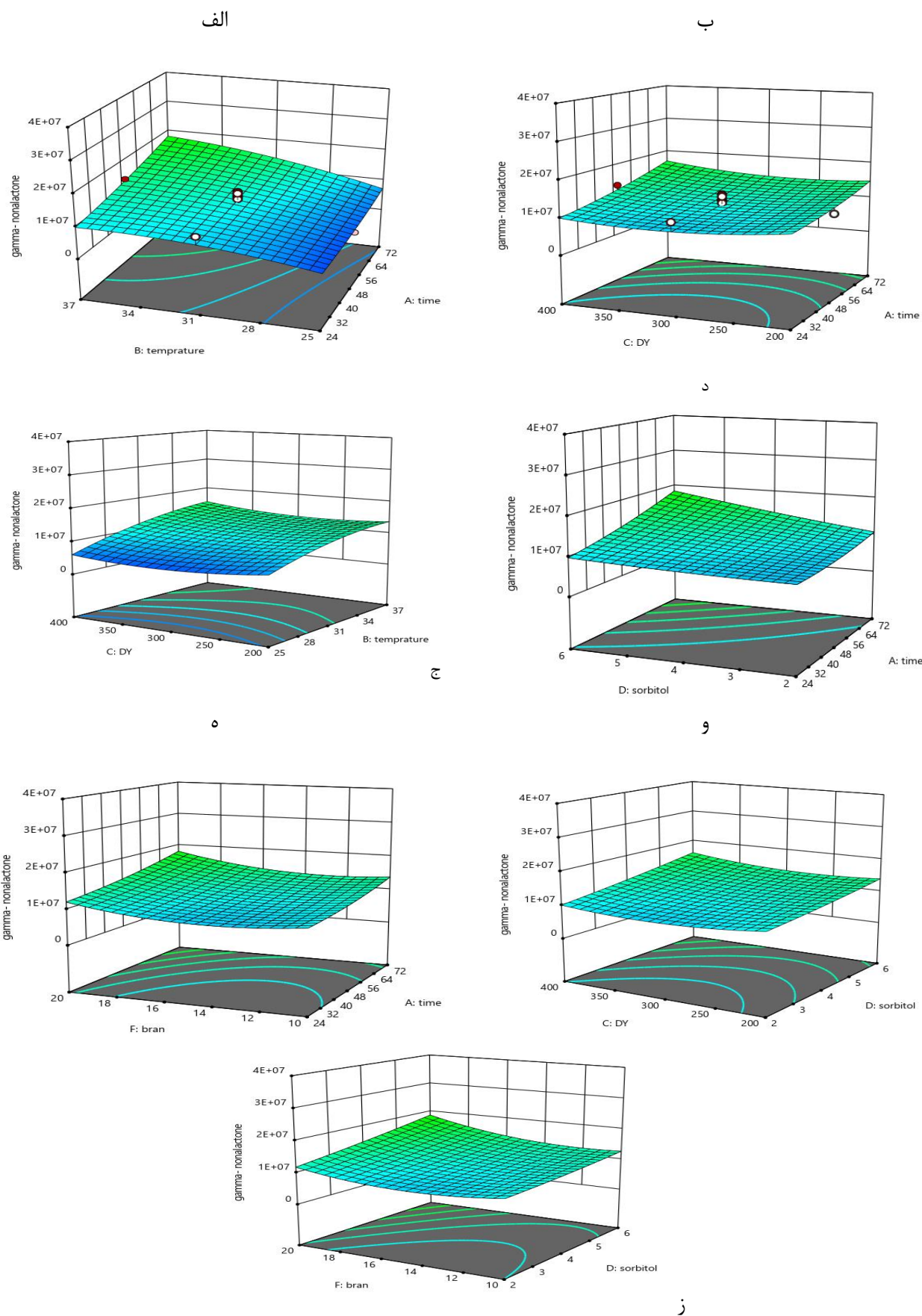
برهم کنش فاکتورها بر روی پاسخ توسط منحنی‌های سطح پاسخ در شکل ۲ نشان داده شده‌اند.

تعیین اعتبار مدل: نقطه بهینه برای تولید گامانوناکتون در خمیر ترش با استفاده از بهینه سازی عددی بدست آمد (جدول ۴). برای ارزیابی اعتبار مدل از بهینه سازی عددی استفاده شد. داده‌های آزمایشی با داده‌های پیش بینی شده توسط مدل اختلاف معنی داری نداشتند. بنابراین نتایج بدست آمده توسط مدل کاملاً قابل اتکا خواهد بود (جدول ۵).

مدل سازی: تأثیر متغیرهای مستقل بر تولید گامانوناکتون با استفاده از مدل درجه دوم تولید شده توسط طرح مرکب مرکزی به صورت ذیل است (فرمول ۱):

$$\begin{aligned}
 \text{Y} = & 1/0.84 \times 10^{-7} + 2/7.55 \times 10^{-6} A + 4/1.74 \times 10^{-6} B + \\
 & 2/2.79 \times 10^{-6} D + 1/8.57 \times 10^{-6} E + 1/4.47 \times 10^{-6} AB + 7/8.0 \times 10^{-5} AC + \\
 & 1/5.62 \times 10^{-6} AD + 5/5.8 \times 10^{-5} AE + 6/4.52 \times 10^{-5} BC + 6/7.77 \times 10^{-5} \\
 & CD - 1/1.7 \times 10^{-6} DE
 \end{aligned} \quad (1)$$

که A, B, C, D و E به ترتیب زمان، دما، راندمان خمیر، درصد سوربیتول و سیوس گندم هستند. جملات مدل بر اساس سطح احتمال ۹۵٪ ارزیابی شده‌اند ($P < 0.05$). اثرات



جدول ۲. منحنی سطح پاسخ-اثرات متقابل موثر بر تولید گامانونا لاکتون: دما×زمان (الف)؛ راندمان خمیر×زمان (ب)؛ راندمان خمیر×دما(ج)؛ سوبیتول×زمان (د)؛ سبوس×زمان (ه)؛ راندمان خمیر×سوبیتول (و)؛ سبوس×سوبیتول (ز)

جدول ۴. شرایط نقطه بهینه انتخاب شده با بهترین مطلوبیت

ترکیب هدف	دما (°C)	زمان (ساعت)	راندمان خمیر	سوربیتول (%)	سبوس (%)	مطلوبیت در نقطه بهینه
گامانوناکتون	۳۷	۷۲	۴۰۰	۶	۲۰	۰/۹۹۵

جدول ۵. نتایج پیش بینی شده توسط مدل و نتایج واقعی بدست آمده با روش HS-SPME-GC-MS در شرایط بهینه

ترکیب هدف	نتیجه پیش بینی شده توسط مدل (سطح پیک) ^۱	نتیجه آزمایشی (سطح پیک)	غلظت واقعی در نمونه (ppm)
گامانوناکتون	$3/31136 \times 10^7 \pm 2/184 \times 10^6$	$2/68968 \times 10^7 \pm 5/2 \times 10^6$	۲۶/۳۱۷۸

۱- انحراف معیار \pm میانگین

• بحث

زمان یکی از مهم‌ترین فاکتورهای موثر بر فرایند تخمیر است. تولید گامانوناکتون به طور معنی‌داری تحت تأثیر زمان است ($P < 0/05$) همان طور که اشاره شد هگزانال ترکیب شروع کننده اصلی برای تولید گامانوناکتون است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقدار هگزانال به تدریج در طی تخمیر کاهش می‌یابد، در حالی که میزان ۱- هگزانول افزایش می‌یابد. تشکیل هگزانال توسط اکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد و سپس تجزیه آن به هگزانول، هگزانوئیک اسید، ۲- بوتیل ۲ اکتانال و سایر انال‌ها می‌تواند منجر به کاهش آن شوند. بنابراین تولید گامانوناکتون در اثر تجزیه هگزانال افزایش یافته است.

دما عاملی است که سینتیک فرایند و نرخ تخمیر و کیفیت محصول نهایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. یافته‌های ما نشان دادند که دما اثر مثبتی در تشکیل گامانوناکتون دارد ($0/05 < P$). بالا بردن دمای تخمیر غلظت محصولات اکسیداسیون لپید را افزایش می‌دهد (20). زمانی که هگزانال در مقادیر بالایی وجود داشته باشد، دچار چندین واکنش جانبی (از جمله ترکم آلدولی) می‌شود. افزایش دما واکنش را به جای تشکیل محصولات هیدروژناسیون به سمت محصولات تراکم آلدول می‌برد. دلیل این پدیده این است که هیدروژناسیون آلدید به الکل اولیه نیازمند انرژی فعال سازی بسیار پایینی است (21). ضمناً تخمیر در دمای بالا (37°C) برای رشد لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس مطلوب تر است. درعین حال افزایش دما بر میزان برخی ترکیبات فرار دیگر مانند الکل‌ها تأثیر منفی دارد زیرا موجب افزایش میزان اتلاف از طریق تبخیر می‌شود.

از آنجا که آردهای مختلف از نظر توانایی جذب آب بسیار متفاوت هستند، بنابراین مقدار راندمان خمیر (DY) منعکس کننده میزان آب به کاررفته در فرمول است. راندمان خمیر

بالتر منجر به افزایش تولید اسید می‌شود. در PH پایین، آلدیدها محصولات تراکم آلدول را تشکیل می‌دهند (22). همچنین در راندمان خمیر بالاتر مواد مغذی به صورت یکنواخت‌تری توزیع می‌شوند که به نوبه خود بر جمعیت میکروبی و فرایند تخمیر موثر است ($23-27$). از طرفی وقتی راندمان خمیر بالاتر باشد فشار رقابتی کمتری برای میکروارگانسیم تخمیر کننده وجود دارد زیرا میکروارگانسیم‌های کمتری از طریق آرد وارد شده‌اند. اما با این وجود میزان راندمان خمیر تأثیر معنی‌داری بر تولید گامانوناکتون نداشت.

بر اساس گزارش Korakli و همکارانش در سال ۲۰۰۳ لاکتوباسیلوس سانفرانسینسیس می‌تواند سوربیتول را از طریق مانیتول دهیدروژناز در طی رشد مصرف کند (13). همچنین سوربیتول می‌تواند طعم تلخ را از طریق شلاته کردن آهن و مس پوشش دهد. از طرفی توانایی هیگروسکوپیک سوربیتول می‌تواند تولید گامانوناکتون را تقویت کند زیرا حضور آب انتخابگری واکنش را به سمت هیدروژناسیون آلدید پیش می‌برد (21). بنابراین محدودیت در دسترسی به آب موجب تقویت تراکم آلدولی و تولید گامانوناکتون می‌شود. یکی از مهم‌ترین مشکلات در تولید صنعتی این است که تجمع آن به شدت برای سلول سمی است (28). به دام افتادن گامانوناکتون به وسیله جاذب‌های هیدروفوبیک می‌تواند به حفظ زنده مانی سلول‌ها در طی تخمیر کمک کند. بنابراین اثر مثبت سوربیتول بر تولید گاما نوناکتون توجیه پذیر است. داده‌های بدست آمده نشان دادند که افزودن سبوس به فرمول تهیه خمیر ترش اثر مثبت ملایمی برای تولید عطر میوه ای در خمیر ترش دارد. زیرا همان‌طور که اشاره شد بتااکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد مثل اولئیک و لینولئیک

نتایج این بررسی نشان داد که سویه لاکتوباسیلوس سانفرانسیسیس قابلیت تولید عطر میوه ای را در خمیر ترش دارد و با بکارگیری این سویه و کنترل شرایط تخمیر، تولید خمیر ترش با عطر مطلوب امکان پذیر است. نتایج این مطالعه می تواند در صنعت نان برای تولید نان حاوی خمیر ترش با عطر و طعم مطلوب مورد استفاده قرار بگیرد.

اسید منجر به تولید لاکتون ها می شود. این اسیدهای چرب آزاد به مقدار زیادی در لایه سبوس وجود دارند. نتایج Zhang و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان داد که لینولئیک اسید در لایه سبوس گندم با غلظت بالایی یافت می شود که مقدار آن بین ۵۲/۲ تا ۶۰ درصد کل اسیدهای چرب آن است (۱۲). از طرفی از آنجا که سبوس منبع غنی از خاکستر است می تواند میزان کل ترکیبات فرار را افزایش دهد.

• References

- Cécile P, Onno B, and Prost C. Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. *Trends Food Sci Technol* 2017; 59: 105-123.
- De Angelis M, Di Cagno R, Gallo G, Curci M, Siragusa S, Crecchio C, et al. Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *Int J Food Microbiol* 2007; 114(1):69-82.
- Farahmand E, Razavi SH, Yarmand MS, Morovatpour M. Development of Iranian rice-bran sourdough breads: physicochemical, microbiological and sensorial characterisation during the storage period. *Qual Assur saf crop* 2015; 7(3): 295-303.
- Omeliński VL. Aroma-producing microorganisms. *J Bacteriol*, 1923; 8(4): 393.
- Aponte M, Boscaino F, Sorrentino A, Coppola R, Masi P, Romano A. effects of fermentation and rye flour on microstructure and volatile compounds of chestnut flour based sourdoughs. *LWT- Food Sci Technol* 2014; 58(2): 387-395.
- Siepmann FB, de Almeida BS, Waszczynskyj N, Spier MR. Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic compounds evolution on type II sourdough and wheat bread. *LWT* 2019; 108:199-206.
- Van Kerrebroeck S, Comasio A, Harth H, De Vuyst L. Impact of starter culture, ingredients, and flour type on sourdough bread volatiles as monitored by selected ion flow tube-mass spectrometry. *Food Res Int* 2018; 106:254-262.
- Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J. *Lactobacillus sanfrancisco*, a key sourdough lactic acid bacterium: physiology, genetic and biotechnology. *Adv Food Sci* 1996; 18(5-6): 167-175.
- Vogel RF, Pavlovic M, Ehrmann MA, Wiezer A, Liesegang H, Offschanka S, et al. Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. In *Microb Cell Fact* 2011; (Vol. 10, No. S1, p. S6). BioMed Central.
- Vermeulen N, Pavlovic M, Ehrmann MA, Gänzle MG, Vogel RF. Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T during growth in sourdough. *Appl Environ Microbiol* 2011; 71(10): 6260-6266.
- De Angelis M, Mariotti L, Rossi J, Servili M, Fox PF, Rollán G, Gobbetti M. Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(12): 6193-6201.
- Gänzle MG, Zheng J. Lifestyles of sourdough lactobacilli—Do they matter for microbial ecology and bread quality? *Int J Food Microbiol* 2019; 302: 15-23.
- Korakli M, Pavlovic M, Gänzle MG, Vogel RF. Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(4): 2073-2079.
- Tieking M, Gänzle MG. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends Food Sci Technol* 2005; 16(1-3): 79-84.
- Schütt J, Schieberle P. Quantitation of nine lactones in dairy cream by stable isotope dilution assays based on novel syntheses of carbon-13-labeled γ -lactones and deuterium-labeled δ -lactones in combination with comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2017; 65(48): 10534-10541.
- Romero-Guido C, Belo I, Ta TMN, Cao-Hoang L, Alchihab M, Gomes N, et al. Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 89(3): 535-547.
- Lampi AM, Damerau A, Li J, Moisio T, Partanen R, Forsell P, Piironen V. Changes in lipids and volatile compounds of oat flours and extrudates during processing and storage. *J Cereal Sci* 2015; 62: 102-109.
- Pico J, Gómez M, Bernal J, Bernal JL. Analytical methods for volatile compounds in wheat bread. *J Chromatogr A* 2016; 1428:55-71.
- Reineccius GA. Flavour-isolation techniques. In *Flavour Frag J* 2007; 409-426. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Birch AN, Petersen MA, Hansen ÅS. The aroma profile of wheat bread crumb influenced by yeast concentration and fermentation temperature. *LWT- Food Sci Technol* 2013, 50(2):480-488.
- Hočvar B, Grilc M, Huš M, Likozar B. Mechanism, ab initio calculations and microkinetics of straight-chain alcohol, ether, ester, aldehyde and carboxylic acid hydrodeoxygenation over Ni-Mo catalyst. *Chem Eng J* 2019; 359: 1339-1351.

22. Abreu I, Da Costa NC, van Es A, Kim JA, Parasar U, Poulsen ML. Natural occurrence of aldol condensation products in Valencia orange oil. *J food sci* 2017; 82(12): 2805-2815.
23. Di Cagno R, Pontonio E, Buchin S, De Angelis M, Lattanzi A, Valerio F, et al. Diversity of the lactic acid bacterium and yeast microbiota in the switch from firm- to liquid-sourdough fermentation. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80(10): 3161-3172.
24. Minervini F, De Angelis M, Di Cagno R, Gobbetti M. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *Int j food microbiol* 2014; 171: 136-146.
25. Gobbetti M, Minervini F, Pontonio E, Di Cagno R, De Angelis M. Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *Int j food microbiol* 2016; 239: 3-18.
26. Vogelmann SA, Seitter M, Singer U, Brandt MJ, Hertel C. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *Int j food microbiol* 2009;130(3): 205-212.
27. De Vuyst L, Vancanneyt M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 2007; 24(2): 120-127.
28. Aguedo M, Waché Y, Mazoyer V, Sequeira-Le Grand A, Belin JM. Increased electron donor and electron acceptor characters enhance the adhesion between oil droplets and cells of *Yarrowia lipolytica* as evaluated by a new cytometric assay. *J agric food chem* 2003; 51(10): 3007-30011.

Optimizing Sourdough Processing for the Production of γ -nonalactone (Fruity Aroma) by *Lactobacillus sanfranciscensis* Using Headspace Solid-Phase Microextraction Method

Farahmand E¹, Razavi S H^{*2}, Mohtasebi SS³

1- Ph.D. Student, Dept. of Food Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2- *Corresponding author: Professor, Dept. of Food Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: srazavi@ut.ac.ir

3- Professor, Dept. of Agricultural Machinery Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Received 15 Jan, 2020

Accepted 23 Apr, 2020

Background and Objectives: Sourdough processing is a well-known method to improve food flavor. One of the most important lactic acid bacteria isolated from sourdoughs is *Lactobacillus sanfranciscensis*. Because of the bacterial ability for acidification and liberation of the volatile compound precursors, it can strongly affect dough rheology and aromatic properties. In this study, the best conditions for production of γ -nonalactone (with fruity aroma) in sourdough were investigated for the first time.

Materials & Methods: To prepare sourdough, a mixture of rye and barley flour and wheat bran was used. Fermentation was carried out using *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 4332. Experiments were designed using response surface methodology and five factors, including time, temperature, dough yield and sorbitol and bran proportions. Volatiles were extracted from sourdough using headspace solid-phase microextraction method. Extracted volatile compounds were measured using gas chromatograph coupled with a mass selective detector.

Results: Effects of independent variables on γ -nonalactone production were modeled using central composite design. Experimental data were similar to the predicted data; therefore, results of this model were reliable. Based on the results, fermentation at 37 °C for 72 h with DY of 400, sorbitol of 6% and 20% of bran provided the most optimum conditions for the production of fruity aroma (26.3 ppm).

Conclusion: Investigation of the aromatic profile of sourdough fermented by *L. sanfranciscensis* showed that this strain was capable of producing desirable aroma during fermentation. Based on the results, time and temperature included strong effects on production of γ -nonalactone. In comparison, dough yield did not include significant effects while addition of bran and sorbitol included mild effects.

Keywords: Sourdough, Flavor, Gas chromatography, HS-SPME, γ -nonalactone