میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس روشی نوین برای ارزیابی فعالیت تخمیری مخمر نانوایی

اصلان عزیزی[a]، عزیز همایونی‌راد[b]، حمیده همایونی‌راد[c]، سوسن هوشمندی[d]، زهرا کسائی[e]*

[a] دانشیارمؤسسه تحقیقاتی فنی و مهندسی صنایع غذایی، وزارت جهاد کشاورزی، کرج، ایران
[b] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[c] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[d] عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
[e] عضو هیأت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، تبریز، ایران

تاریخ دریافت مقاله : ۱۳۹۴/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله : ۱۳۹۵/۷/۷

چکیده

مقدمه: عملکرد تکنولوژیکی مخمر نانوایی ارتباط تنگاتنگی با قابلیت زنده‌مانی آن دارد. به منظور پیش بینی خصوصیات عملکردی مخمر نانوایی، مشاهده زنده مانی و تفکیک مخمرهای زنده از مخمرهای مرده در محیط تخمیر به روشی سریع و دقیق نیاز است.

مواد و روش‌ها: در این مقاله با انتخاب سه نمونه مخمرخشک فوری، از میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس، ۰/۰۲٪ محلول رنگی FDA (فلورزین دی استات) و ۰/۱٪ اوانس بلو جهت مشاهده زنده‌مانی و از دستگاه گازوگرافی برای اندازه‌گیری قدرت تولید گاز مخمرها استفاده شد. تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی توسط آزمون میکروبی تعیین شد. آزمون پخت نیز برای بررسی حجم و ارتفاع نان‌ها انجام گرفت.

یافته‌ها: مخمر A با بیشترین تعداد سلول سبز رنگ مشاهده شده توسط میکروسکوپ اپی فلورسانس (۱۷۸±۷/۴)، بیشترین تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی ($۱۵×۱۰^{۱۰}$cfu/mg)، بیشترین میزان گاز تولیدی (۱۶۳/۳±۱/۹ ml CO_2/3h)، بیشترین حجم ($۱۳۲/۲±۱۰/۰۳cm^3$) و بیشترین ارتفاع نان (۴/۷۲±۰/۳۵ cm) را نشان داد. مخمر C با کمترین تعداد سلول‌های سبز (۱۰۲/۲±۸/۹۷)، کمترین تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی ($۱۲×۱۰^{۱۰}$cfu/mg)، کمترین میزان گاز تولیدی (۱۳۹/۶۷±۱/۶ ml CO_2/3h)، کمترین حجم ($۱۰۸/۳۳±۶/۲۱ cm^3$) و نیز کمترین ارتفاع نان (۳/۸۱±۰/۳ cm) را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که رابطه مستقیم بین تعداد سلول‌های زنده مشاهده شده در آزمون رنگ‌آمیزی توسط میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس، قدرت تولید گاز آنها و همچنین عملکرد نانوایی مخمر ساکارومایسس سرویسیا از منظر تکنولوژیکی وجود دارد. با استفاده از میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس و محلول‌های رنگ آمیزی فوق به سادگی می‌توان قدرت تولید گاز مخمر مورد نظر را در محیط تخمیر پیش بینی کرد و بدین ترتیب می‌توان این روش را جایگزین روشهای طولانی مدت تحقیقاتی کرد.

واژه های کلیدی: *زنده‌مانی، قدرت تولید گاز، مخمر نانوائی، میکروسکوپ نوری اپی فلوروسانس*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: Tabrizu1986@yahoo.com

مقدمه

در کلیه روش‌های پخت نان، از مخمر برای ایجاد حجم، بهبود طعم، بهبود کیفیت گلوتن و افزایش قابلیت هضم نان حاصل استفاده می‌شود (پایان، ۱۳۸۰). ضرورت استفاده از مخمر بعنوان یک ترکیب کلیدی در صنعت نانوایی بر کسی پوشیده نیست. موضوع مهم در این رابطه توانایی تولید گاز و قابلیت زنده مانی مخمر است و این امر به وضوح ثابت گشته که قابلیت تولید مناسب گاز توسط مخمر و ظرفیت بهینه نگهداری آن در خمیر، پیش نیازهای اصلی برای تولید موفق نان می‌باشند. (Dobbes *et al.*, 1982)

به دلیل اهمیت این موضوع، توجه متخصصان امر به آن جلب شده و ماحصل تلاش آنها در دو بخش عمده آمده است. بخش نخست بررسی میزان تولید گاز دی اکسید کربن توسط مخمر نانوایی و بخش دیگر مربوط به بررسی زنده‌مانی آن‌ها با انجام آزمون‌های خاص می‌باشد. اندازه‌گیری میزان گاز تولیدی توسط دانشمندان زیادی انجام گرفته و به سنجش میزان حجم و فشار گاز تولیدی پرداخته‌اند (Guillermo *et al.*, 2009). مقایسه روش‌های مختلف ارزیابی قدرت تولید گاز و فعالیت تخمیری مخمر نانوایی نیز صورت گرفته است (کسائی و همکاران، ۱۳۹۱). برای مشاهده زنده‌مانی مخمرها روش‌های میکروبی و میکروسکوپی به کار گرفته شده‌اند که با استفاده از محیط‌کشت مخصوص از روش شمارش میکروسکوپی این عمل انجام می‌پذیرد. تحقیقاتی که در مورد زنده‌مانی مخمر نانوایی صورت گرفته محدودتر از تحقیقاتی هستند که در مورد قدرت تولید گاز آنها انجام گرفته است.دانشمندان با استفاده از رنگ آمیزی متیلن بلو و بوسیله دی الکتروفورز به برقراری ارتباط بین فعالیت حجم دهندگی مخمر و قابلیت زنده مانی آنها پرداختند. قابلیت زنده‌مانی مخمر یک مفهوم نسبی است. بدین معنی که سلول‌های مخمر می‌توانند زنده باشند اما فعال نباشند. توانایی سلول‌های مخمر برای رشد و تولید مثل، همان فعالیت مخمرهاست که مهم‌تر از زنده بودنشان است (Girula *et al.*, 1985). از آنجائیکه گاز CO_2 در طی تخمیر توسط مخمرها تولید می‌شود، اندازه‌گیری حجم گاز تولیدی می‌تواند سنجش مناسبی برای دستیابی به میزان فعالیت مخمر باشد. این روش نیز دارای معایبی است. از جمله اینکه میزان نمونه مورد نیاز برای بررسی‌های مذکور زیاد است و کارهای دستی زیادی را می‌طلبد و برای مطالعه مخمرها زمانی که خمیر در حالت انجماد است نمی‌تواند کاربرد داشته باشد. همچنین برای مطالعه رفتار مخمر در نقاط مختلف خمیر مناسب نمی‌باشد ولی در کنار روش‌های فشار سنجی و دستگاهی رایج به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد. این محقان روش رنگ آمیزی جدیدی ارائه کردند که مبتنی بر استفاده از روش DAPI (۴ و۶ دی آمینو، ۲ فنیل ایندول) و اوانس بلو و جستجوی فلورسنس بود. علاوه براین محققان مذکور از فرمانتوگراف استفاده کرده و اظهار داشتند که میزان خطا در این روش حدود ۵٪ می‌باشد (Autio *et al.*, 1992).میزان زنده‌مانی مخمرها بر حسب تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی بر گرم ماده خشک بیان می‌شود و بدین ترتیب می‌توان با استفاده از این داده‌ها به اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی و بقای سلول‌های مخمری پرداخت. محققان با حل کردن ۱ گرم مخمر خشک در ۹ میلی لیتر تریپتوفان سالت بافر و سپس کشت در محیط گلوکز آگار و انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت توانستند میزان زنده‌مانی مخمرها را بصورت درصد بیان کنند (Rubenthaler *et al.*, 1980).

دراین مقاله با استفاده از میکروسکوپ نوری اپی فلوروسانس، آزمون گازوگرافی، آزمون میکروبی و آزمون پخت به بررسی میزان زنده مانی سه نوع مخمر نانوایی خشک فوری (ساکارومایسس سرویسیا) و بررسی ارتباط میان این روش‌ها پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

- مواد

سه نمونه پودر مخمر نانوایی خشک فوری ساخت ایران، مخمر (A)، (B) و (C)، آرد، محلول‌های رنگ آمیزی فلورزین دی استات و اوانس بلو، میکسر نانوایی، میکروسکوپ نوری اپی فلوروسانس (مدل ای ۱۰۰۰)، فر پخت، دستگاه گازوگراف و محیط کشت YGC Agar.

سه نوع نمونه مخمر مورد آزمون، پودر نانوایی خشک فوری *Saccharomyces cerevisiae* هستند که از بازار محلی خریداری شدند. مشخصات مخمرهای مورد آزمون در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱- مشخصات مخمرهای مورد آزمون

نام مخمر	مشخصه مخمر
A	پودر مخمر نانوایی خشک فوری *Saccharomyces cerevisiae* (ADY)
B	پودر مخمر نانوایی خشک فوری *Saccharomyces cerevisiae* (ADY)
C	پودر مخمر نانوایی خشک فوری *Saccharomyces cerevisiae* (ADY)

روش‌ها

- آزمون گازوگرافی

از این آزمون به منظور بررسی قدرت تولید گاز مخمر ساکارومایسس سرویسیا مورد آزمون در محیط تخمیر استفاده شد. در این روش با اختلاط ۱۰ گرم آرد و ۷ سی سی آب و ۰/۳۸ گرم مخمر خشک فوری، گلوله خمیر تهیه شده و بعد از چانه گیری بلافاصله داخل یک بشر که جهت جلوگیری از ورود هوا کاملا عایق بندی شده است قرار می‌گیرد. بشر از طریق لوله رابط به یک استوانه مدرج معکوس متصل گشته است تا در مدت زمان ۱۸۰ دقیقه گازهای تولیدی در آن جمع گشته و مشاهده گردند. این سیستم در داخل حمام آبی که دارای دمای ثابت ۳۸ درجه سانتیگراد است قرار می‌گیرد. میزان گاز تولیدی هر یک دقیقه یادداشت گردید. سه مخمر مورد آزمون در سه تکرار به مدت ۱۸۰ دقیقه مورد آزمون قرار گرفتند (Pieghambardoust *et al.*, 2010).

- آزمون میکروبی

از آزمون میکروبی جهت بررسی میزان فعال بودن مخمرهای مورد مطالعه استفاده شد. در این روش ۲۵ گرم مخمر با ۱۷۵ میلی‌لیتر آب مخلوط شد. نیمی از سوسپانسیون در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت حرارت داده شد. قابلیت زنده مانی این سوسپانسیون از طریق شمارش میکروبی بررسی شد. سپس سوسپانسیون مرده و سوسپانسیون فعال، توسط یک همزن مغناطیسی به آرامی و با نسبت‌های خاص با هم مخلوط شدند. برای شمارش سلول‌های مخمری نیز از این روش استفاده شد که سوسپانسیون مخمری با درصدهای مختلف زنده به مرده (۱۰۰ به صفر، ۷۵ به ۲۵ و ۵۰ به ۵۰) روی محیط کشت YGC Agar و به روش پورپلیت کشت داده شده و بعد از ۵ روز انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی (CFU) شمارش شدند. بدین صورت که تعداد کلنی‌های تشکیل شده در پلیت‌ها شمارش شده و در عکس رقت سوسپانسیون مورد نظر ضرب شدند. نمونه ها در دو تکرار کشت داده شدند (Autio *et al.*, 1992).

- آزمون میکروسکوپ اپی فلوروسنس

مطالعات میکروسکوپی با روش ارائه شده توسط Yokoyama و همکاران (۲۰۰۳) با اندک تغییرات ارائه شده توسط کسائی(۱۳۹۰) و با استفاده از میکروسکوپ نوری اپی فلوروسانس مدل ای ۱۰۰۰، ساخت شرکت نیکون ژاپن انجام گرفت. تصویربرداری با دوربین پیشرفته خنک شونده[1] نیکون اکلیپس[2] با قدرت تفکیک رنگ ۱۴ بیت به ازاء هر کانال (RGB) صورت گرفت و تعداد سلول‌های مخمر فعال شمارش شدند. سوسپانسیون مخمری مورد آزمون با رقت 10^4 تهیه شده و قطره ای از آن روی لام ریخته شد. رنگ‌آمیزی به روش رنگ آمیزی مزدوج انجام گرفت. بدین صورت که روی سوسپانسیون مورد نظر یک قطره محلول ۰/۰۲٪ FDA[3] و بلافاصله یک قطره محلول ۰/۱٪ اوانس بلو به محیط رنگ‌آمیزی افزوده شده و روی شیشه لام گسترده شد. این کار برای رنگ آمیزی سلول‌های مخمری زنده و مرده بصورت همزمان انجام گرفته و مدت زمان ۱۰ دقیقه برای جذب و تثبیت رنگ به سلول‌های مخمری اختصاص داده شد. در نهایت مشاهدات میکروسکوپ اپی فلوروسنس انجام گرفته و تصاویر سلول‌های مخمری با استفاده از دوربین پیشرفته خنک شونده نیکون گرفته شد. از هر سوسپانسیون مخمری ۵ تصویر و از میدان‌های مختلف دید میکروسکوپی گرفته شده و در نهایت شمارش سلول‌ها انجام گرفتند (Yokoyama *et al.*,1997)

[1] Cooled CCD [2] Nikon, Eclipse, Evolution MP [3] Fluoresciendiacetate

- آزمون پخت

برای پخت نان سه نمونه مخمر، از این روش استفاده گردید: ۵۳۰ گرم آرد با ۲۸۰۰ میلی لیتر آب مخلوط شده ۱/۵٪ مخمر و ۵ گرم نمک طعام تصفیه شده بدون ید (تهیه شده از بازار محلی) به مخلوط حاضر اضافه گشت. فرمانتاسیون دردمای ۳۰ درجه سانتیگراد، با رطوبت نسبی ۷۵٪ و به مدت ۹۰ دقیقه انجام گرفت. مرحله بعد چانه‌گیری و شکل‌دهی خمیر و بعد تخمیر میانی و در نهایت شکل دهی و تخمیر نهایی بود. این کار در مدت زمان ۶۰ دقیقه، بارطوبت نسبی ۷۵٪ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. بعد از سپری شدن دوره‌های تخمیر اولیه و نهایی، پخت نان از ۵۰ گرم خمیر در قالب‌های کوچک به ابعاد ۷۰ ×۳۰×۳۰ میلی متر در مدت زمان ۲۵ دقیقه در ۲۰۰ درجه سانتی گراد انجام گرفت. برای پخت نان از دستگاه فر پخت نان کارگاهی مجهز به محفظه‌های جداگانه تخمیر و پخت با قابلیت تزریق بخار فشرده استفاده شد (کسائی، ۱۳۹۰).

- اندازه گیری حجم و ارتفاع نان

جهت اندازه‌گیری حجم از روش حجم سنجی جابجایی دانه کلزا (بر اساس استاندارد A-A-20126E METRIC) استفاده گردید. پس از انجام برش طولی قرص نان، ارتفاع آن با خط کش اندازه گیری شد.

یافته‌ها

- آزمون گازوگرافی

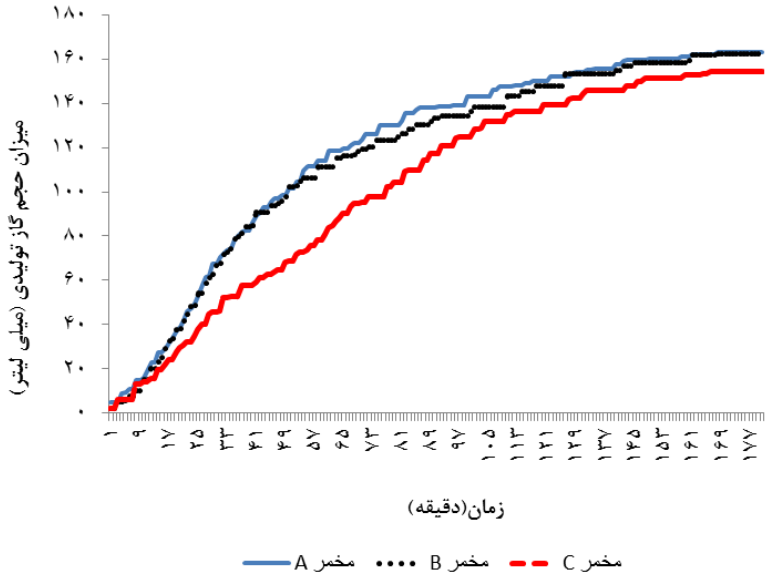
مخمرها در سه تکرار به مدت ۱۸۰ دقیقه مورد آزمون قرار گرفته، میانگین سه تکرار محاسبه گشته و مقایسه دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت. میانگین حجم گاز تولیدی مخمر A (۱۶۳/۳±۱/۹ ml) بیشتر از مخمر B (۱۶۲/۳±۱/۴ ml) و نیز مخمر C (۱۵۴/۳±۱/۴ ml) است (نمودار ۱). مخمر B تفاوت چندانی با مخمر A نشان نداد. اما میزان گاز تولیدی توسط مخمر C با دو مخمر دیگر تفاوت قابل ملاحظه‌ای (نمودار ۲) در سطح احتمال $p<0.05$ دارد.

- نتایج آزمون میکروبی

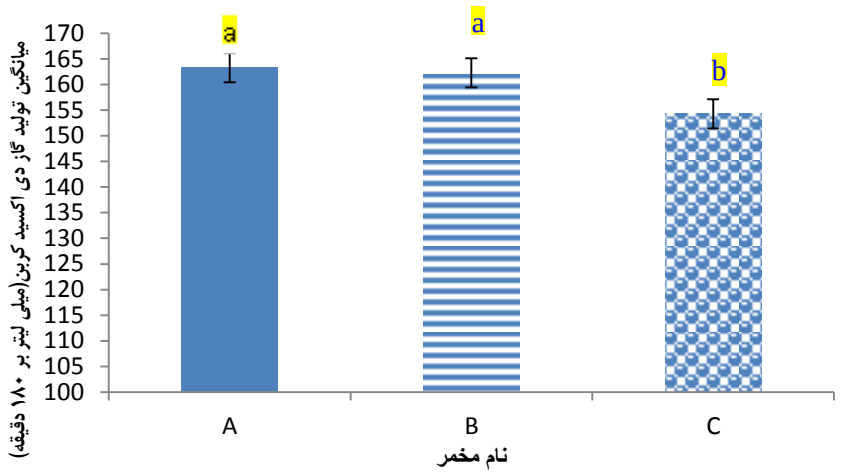
شمارش تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی (CFU) سوسپانسیون مخمری

بر طبق جدول ۲ نتایج حاصل از شمارش سلولی و نیز میزان نسبت سلول‌های زنده و مرده در سوسپانسیون مخمر– آب ارتباط مستقیمی با هم نشان دادند.

هرچه تعداد سلول‌های مخمری زنده بیشتر باشد تعداد کلنی فرم یونیت‌ها نیز بیشتر خواهد بود. این موضوع با مقایسه درصدهای فوق به سادگی قابل درک است. مقایسه حالت ۱۰۰ به صفر سوسپانسیون مخمرها نیز بر قدرت بیشتر مخمر A نسبت به دو مخمر دیگر دلالت دارد.



نمودار ۱– مقایسه حجم گاز تولیدی سه مخمر در مدت زمان ۱۸۰ دقیقه (میلی لیتر/ دقیقه)



نمودار ۲- مقایسه آماری تفاوت قدرت تولید گاز دی اکسید کربن توسط سه نمونه مخمر

حروف متفاوت نشانه حداقل اختلاف معنی دار می باشند ($p<0.05$).

جدول ۲- شمارش CFU سلول های مخمرهای B, A و C با نسبت‌های مختلف مخمرهای زنده به مرده

مخمر	نسبت صفر به ۱۰۰ سلول زنده به مرده (CFU/ml)	نسبت ۲۵ به ۷۵ سلول زنده به مرده (CFU/ml)	نسبت ۵۰ به ۵۰ سلول زنده به مرده (CFU/ml)	نسبت ۷۵ به ۲۵ سلول زنده به مرده (CFU/ml)	نسبت ۱۰۰ به صفر سلول زنده به مرده (CFU/ml)
A	صفر	۳/۷×۱۰^۱۰	۶/۹×۱۰^۱۰	۱۰/۹×۱۰^۱۰	۱۵×۱۰^۱۰
B	صفر	۳/۱×۱۰^۱۰	۵/۹×۱۰^۱۰	۱۰/۲×۱۰^۱۰	۱۴/۶×۱۰^۱۰
C	صفر	۱/۹×۱۰^۱۰	۳/۹×۱۰^۱۰	۸×۱۰^۱۰	۱۲×۱۰^۱۰

* نتایج حاصل با دو تکرار بدست آمده اند.

- نتایج آزمون میکروسکوپی

تصاویر و نتایج مربوط به آزمون‌های رنگ‌آمیزی با میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس

رنگ آمیزی با میکروسکوپ اپی فلوروسنس در تمامی تیمارها بصورت Double staining (رنگ آمیزی همزمان توسط FDA و اوانس بلو) انجام گرفت. تصاویر در مقیاس ۶۵۰×۸۵۰ میکرون و با قدرت بزرگنمایی ۱۰× گرفته شده است. در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ به مقایسه سوسپانسیون‌های مخمری ۱۰۰٪ زنده سه نمونه مخمر نانوایی پرداخته شده است.. سوسپانسیون آب - مخمر هر سه تیمار تحت تاثیر رنگ آمیزی همزمان قرار گرفته و پس از رنگ آمیزی تعداد سلول‌های زنده که به رنگ سبز درآمدند مورد مقایسه قرار گرفتند. عدم حضور سلول‌های قرمز زنگ به دلیل زنده بودن تمامی سلول‌های مخمری در سوسپانسیون هاست. اگر چنانچه مخمر مرده‌ای در محیط رنگ‌آمیزی وجود داشته باشد تحت تاثیر محلول اوانس بلو به رنگ قرمز درمی‌آید.

همانگونه که در شکل ۱ دیده می‌شود مخمر A با تفاوت بسیار کمی از مخمر B، رنگ پذیری بیشتری داشته و با تفاوت بسیارجزیی، از مخمر B قویتر است. با مقایسه دو شکل ۲ و ۳ مشاهده می‌شود که مخمر B نسبت به مخمر C قوی تر بوده و مخمر C دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای ($p<0.05$) با مخمرهای A و B است. این نتایج کاملا مطابق با نتایج حاصل از آزمون‌های قبلی است.

شمارش تعداد سلول‌های مخمری زنده و مرده در سوسپانسیون‌های مخمری

شمارش تعداد مخمرهای زنده و مرده رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری اپی فلوروسانس انجام پذیرفت. نتایج در جدول ۳ آمده است. شمارش در پنج تکرار و در میدان میکروسکوپی ۶۵۰×۸۵۰ میکرون انجام گرفت و میانگین شمارش، مقیاس مقایسه قرار گرفت.

- نتایج حاصل از آزمون پخت

حجم و ارتفاع نان های حاصله

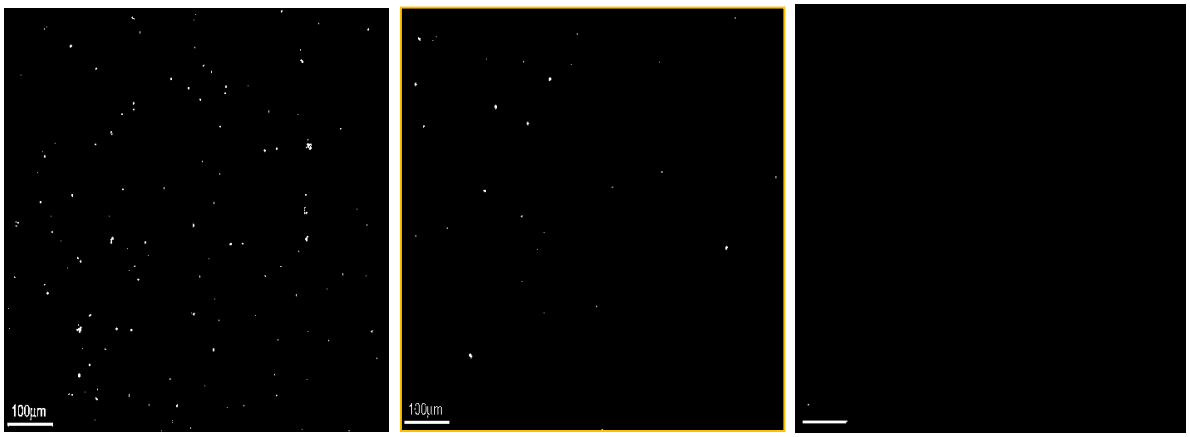
همانگونه که از آزمون‌های گازوگرافی، میکروبی و

میکروسکوپی به دست آمد فعالیت مخمرهای نانوایی به ترتیب از مخمر A تا مخمر C رفته رفته کمتر شد. نتایج حاصل از آزمون پخت (حجم و ارتفاع نان) دقیقا مشابه نتایج حاصل از دو آزمون قبلی به دست آمد.

در زیر ارتفاع نان های حاصل از سه تیمار مورد آزمون با هم مقایسه شده اند. همانگونه که از جدول ۴ مشخص است ارتفاع نان حاصل از مخمر A بیشترین میزان و ارتفاع نان حاصل از مخمر C کمترین میزان است. این امر به دلیل تعداد بیشتر سلول‌های زنده و فعال در مخمر A نسبت به مخمر B و نیز مخمر C می‌باشد.

همانگونه که در جدول ۵ مشخص است حجم نان حاصل از مخمر A بیشترین میزان و حجم نان حاصل از مخمر C کمترین میزان است. مخمر A به دلیل بالا بودن تعداد سلول‌های زنده، توانایی تولید گاز بیشتری داشته و حجم و ارتفاع نان حاصل از آن نیز بیشتر خواهد بود.

داده‌های حاصل از حجم و ارتفاع موید نتایج قبلی بوده و به قرار زیر به دست آمدند. در مورد هر دو آزمون (حجم سنجی و ارتفاع سنجی نان)، مخمر A بیشترین حجم و ارتفاع نان و مخمر C کمترین حجم و ارتفاع را به خود اختصاص داد.



شکل۱- سوسپانسیون مخمرهای A، B و C ۱۰۰٪ زنده، مخمرها تحت تاثیر رنگ فلوروزین دی استات به رنگ سبز درآمده‌اند. بزرگنمایی ۱۰× (در تصویر سیاه و سفید بصورت ذرات ریز سفید رنگ در زمینه سیاه قابل مشاهده‌اند.)

جدول ۳- شمارش تعداد سلول‌های مخمری زنده و مرده در سوسپانسیون‌های مخمری هر سه تیمار

نام مخمر	تعداد سلول‌های شمارش شده در میدان دید میکروسکوپی
A	۱۷۷/۸±۷/۳۶ [a]
B	۱۶۸/۲±۷/۹۸ [a]
C	۱۰۲/۲±۸/۹۷ [b]

*نتایج حاصل با پنج تکرار بدست آمده اند.

حروف متفاوت نشانه حداقل اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p<0.05$).

جدول ٤- مقایسه ارتفاع نان‌های حاصل از سه نمونه مخمر

نام مخمر	ارتفاع نان حاصله (سانتی‌متر)
A	۴/۷۲±۰/۳۵ [a]
B	۴/۶۱±۰/۳۷ [a]
C	۳/۸۱±۰/ ۳ [b]

*نتایج حاصل با سه تکرار بدست آمده اند.

حروف متفاوت نشانه حداقل اختلاف معنی دار می باشند ($p<0.05$).

جدول ۵- مقایسه حجم نان‌های حاصل از سه نمونه مخمر

نام مخمر	حجم نان حاصله (سانتی‌متر مکعب)
A	۱۳۲/۲۲±۸/۰۳ [a]
B	۱۳۰/۵۵±۶/۳۴ [a]
C	۱۰۸/۳۳±۶/۲۱ [b]

*نتایج حاصل با سه تکرار بدست آمده اند.

حروف متفاوت نشانه حداقل اختلاف معنی دار می باشند ($p<0.05$).

- مقایسه آزمون‌های انجام یافته و نتایج حاصله

در جدول ۶ نتایج حاصل از آزمون‌های انجام گرفته در مورد سه مخمر A و B و C با هم مقایسه شده اند. نتایج در مورد تمام آزمون‌ها یکسان بوده و حاکی از قدرت بیشتر مخمر A نسبت به دو مخمر دیگر بوده و نشان دادند که هرچه میزان حجم گاز تولیدی در آزمون گازوگرافی و میزان واحدهای تشکیل دهنده کلنی در آزمون میکروبی بیشتر باشد، حجم و ارتفاع نان حاصله نیز بیشتر خواهد بود. این نتایج در آزمون میکروسکوپی با مشاهدات عینی تایید شده و نشان دادند که هر چه زنده‌مانی مخمر در محیط تخمیر بیشتر باشد، تعداد سلول‌های مخمری که تحت تاثیرمحلول رنگی FDA به رنگ سبز در می آیند بیشتر بوده و هر چه این تعداد بیشتر باشد فعالیت تخمیری مخمر نانوایی بیشتر خواهد بود. بنابراین میتوان با استفاده از میکروسکوپ نوری اپی فلوروسنس به مقایسه قدرت تخمیری مخمرهای تجاری بدون نیاز به آزمون‌های طولانی مدت گازوگرافی، میکروبی و پخت پرداخت.

در جدول ۷ همبستگی ساده پیرسون بین آزمون‌های گازوگرافی، میکروبی، میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس و آزمون پخت نشان داده شده است. تمامی آزمون‌ها دارای همبستگی در سطح احتمال ۰/۰۱ می باشند.

بحث

- بررسی اثر نسبت سلول‌های مرده و زنده بر روی میزان حجم گاز تولیدی و شمارش سلولی سلول‌های مخمری

هرچه میزان زنده‌مانی سلول‌های مخمر در محیط تخمیر بیشتر باشد تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی نیز بیشتر خواهد بود. بنابراین ارتباط کاملا مستقیم بین میزان سلول‌های مخمری زنده و توانایی تولید گاز دی اکسیدکربن توسط آنها وجود دارد. کشتن سلول‌های مخمری توسط حرارت کاملا این موضوع را تائید کرد.

- شمارش تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی (CFU) سوسپانسیون مخمری

در مورد سه مخمر A ، B و C این تعداد (در تمامی نسبت های سوسپانسیونی زنده به مرده) در مورد مخمر A بیشترین و در مورد مخمر C کمترین تعداد بدست آمد. روند مشاهده شده در این آزمون موید نتایج آزمون‌های قبلی بوده و نشان داد هرچه میزان کلنی های تشکیل شده بیشتر باشد قدرت تولید گاز بیشتری نیز نشان خواهد داد.

- تاثیر درصد سلول‌های مخمری زنده بر روی میزان تولید گاز دی اکسید کربن

زمانیکه ۵۰٪ سلول‌های مخمری **A** توسط حرارت

جدول ٦- مقایسه کلی آزمون‌های انجام یافته

آزمون /مخمر	A	B	C
گازوگرافی (ml)	۱۶۳/۳۳±۱/۹	۱۶۲/۳۳±۱/۴	۱۵۴/۳۳±۱/۴
میکروبی (cfu/mg)	$۱۵×۱۰^{۱۰}$	$۱۴/۶×۱۰^{۱۰}$	$۱۲×۱۰^{۱۰}$
میکروسکوپی	۱۷۷/۸±۷/۳۶	۱۶۸/۲±۷/۹۸	۱۰۲/۲±۸/۹۷
حجم نان (cm^3)	۱۳۲/۲۲±۸/۰۳	۱۳۰/۵۵±۶/۳۴	۱۰۸/۳۳±۶/۲۱
ارتفاع نان (cm)	۴/۷۲±۰/۳۵	۴/۶۱±۰/۳۷	۳/۸۱±۰/۳

جدول ۷- همبستگی ساده پیرسون بین آزمون‌ها

نام آزمون	گازوگرافی	آزمون میکروبی	میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس
گازوگرافی			
آزمون میکروبی	۰/۹۷**		
میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس	۰/۹۷**	۰/۹۵**	
آزمون پخت	۰/۹۷**	۰/۹۷**	۰/۹۶**

**: معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱

دهی کشته شدند، حدود ۴۰ ٪ کاهش حجم را نسبت به زمانیکه ۱۰۰٪ سلول‌های مخمری محیط تخمیری، زنده هستند شاهدیم. این بدین معنی است که هرچه میزان سلول‌های مخمری زنده بیشتر باشد میزان تولید گاز دی اکسیدکربن نیز بیشتر خواهد بود.

- بررسی تعداد سلول‌های مخمری زنده و مرده در سوسپانسیون‌های مخمری و رنگ‌آمیزی با میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس

مشاهده تعداد بیشتر سلولهای مخمری سبز رنگ دال بر زنده مانی بیشتر مخمرها و قابلیت زیستی و عملکردی بالاتر آنها است. این نتایج کاملا مطابق با نتایج حاصل از آزمون‌های قبلی است.

نتیجه‌گیری

با بررسی نتایج حاصل از مطالعات میکروبی، میزان قدرت حجم دهی، مطالعات میکروسکوپی از دیدگاه زنده مانی مخمر نانوایی و نیز آزمون پخت، میتوان اظهار داشت که رابطه مستقیم بین تعداد سلول‌های زنده مشاهده شده در آزمون رنگ آمیزی توسط میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس، قدرت تولید گاز آنها و همچنین عملکرد نانوایی مخمر ساکارومایسس سرویسیا از منظر تکنولوژیکی وجود دارد. وضوح سلول‌های مخمری زنده با بکارگیری اوانس بلو بیشتر شده و جزئیات بیشتری از محیط را ارائه میدهند. این درحالیست که سلول‌های مرده را نیز به رنگ قرمز نمایان میکند. با رنگ آمیزی همزمان با دو محلول رنگی فلورزین دی استات و اوانس بلو، سلول‌ها از هم متمایز شده و می‌توان به راحتی به پیش بینی قدرت عملکردی مخمر نانوایی در محیط تخمیر پرداخت. با استفاده از میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس و محلول‌های رنگ آمیزی فوق به سادگی می‌توان قدرت تولید گاز مخمر مورد نظر را در محیط تخمیر پیش بینی کرد و بدین ترتیب میتوان این روش را جایگزین روش‌های طولانی مدت تحقیقاتی کرد.

منابع

پایان، ر. (۱۳۸۰). مقدمه ای بر تکنولوژی فرآورده های غلات. انتشارات نورپرداران، صفحه ۹۹

کسائی، ز. (۱۳۹۰). مقایسه روش‌های ارزیابی زنده مانی، قدرت تولید گاز و فعالیت تخمیری مخمر نانوائی (ساکارومایسس سرویسیا). پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی – علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

Autio, K. Mattila, D. Sandholm, T. (1992). Detection of active yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) in frozen dough sections. Applied and Environmental Microbiology, 58: 2153-2157.

Dobbes, M. Peleg, R.E. Mudgett. A. (1982). Some physical characteristics of active dry yeast, Powder technology. 32: 63 – 69.

Girula, M. Watson, M. Pohl, H.A. (1985). Relationship between dough-raising activity of baker's yeast and the fraction of 'vital' cells as determined by Methylene Blue staining or by Dielectrophoresis, Journal of Biological Physics, 13.

Guillermo, G. Bellido, a. Martin, G. Scanlon, A. John, H. (2009). Measurement of dough specific volume in chemically leavened dough systems. Journal of Cereal Science, 49: 212–218.

Kasaie, Z. Peighambardoust, S.H. Dadpour, M.R. Moosavy, M.H. Shakuoie Bonab, E. (2013). Comparing different methods for evaluating gassing power and fermentation activity of baker's yeast. Food research journal, 22:432-442

Katina, K. 2005. Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. VTT

Biotechnology. VTT Technical Research Centre of Finland, VTT 569: 13-41, 53-75.

Pieghambardoust S.H., E. Fallah, Hamer. R.A,Van Der Goot. (2010). Aeration of bread dough influenced by different way processing. Journal of Cereal Science. 59(1):89-95.

Rubenthaler, G.L. Finney, P.L. Demaray, D.E. Finney, K.F. (1980). Gasograph, design, construction, and reproducibility of a sensitive 12-channel gas recording instrument. Cereal Chemistry, 57: 212-216.

Yokoyama, H. Danjo, T. Ogawa K. Wakabayashi, H. (1997). A vital staining technique with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) for the determination of viability of myxosporean and actinosporean spores. Journal of Fish Diseases. 20: 4, 281–286.