

## استفاده از میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس (EFLM) برای ارزیابی فعالیت مخمر نانوبی (ساکارومایسس سرویسیا) و مقایسه آن با روش‌های متداول

سید هادی پیغمبردوست<sup>۱\*</sup>، زهرا کسائی<sup>۲</sup>، محمدرضا دادپور<sup>۲</sup>، میرحسن موسوی<sup>۴</sup> و عارف اولاد غفاری<sup>۵</sup>

۱. استاد، تکنولوژی مواد غذایی، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۴. دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

۵. عضو هیأت علمی، گروه پژوهشی مواد غذایی، پژوهشکده غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۲۸ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۵/۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۵/۲۵)

### چکیده

در این مطالعه از میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس (EFLM) برای مشاهده زنده‌مانی مخمر نانوبی و ارزیابی فعالیت آن استفاده شد. فعالیت تخمیری سه نوع مخمر تجارتي (A-C) با روش EFLM و آزمون‌های گازوگرافی، میکروبی و پخت نان مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. رنگ آمیزی مزدوج و همزمان سوسپانسیون‌های مخمری در روش EFLM، سلول‌های زنده را با رنگ سبز و سلول‌های مرده را با رنگ قرمز مشخص کرد. مخمر A با بیشترین تعداد سلول سبز رنگ (۱۷۸ سلول شمارش شده در تصویر میکروسکوپی) در رتبه نخست و مخمر C با کمترین تعداد (۱۰۲ سلول شمارش شده) در رتبه آخر زنده‌مانی قرار گرفت. در آزمون میکروبی تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در مخمر A بیشترین ( $1.5 \times 10^8$  cfu/mg) و در مخمر C کمترین ( $1.2 \times 10^7$  cfu/mg) بود. در روش گازوگرافی مخمر A بیشترین ( $163 \text{ ml CO}_2/3\text{h}$ ) و مخمر C کمترین ( $140 \text{ ml CO}_2/3\text{h}$ ) مقدار گاز را تولید کرد. در آزمون پخت، مخمر A بیشترین حجم ( $132 \text{ cm}^3$ ) و مخمر C کمترین حجم ( $108 \text{ cm}^3$ ) نان را نشان داد. نتایج نشان دادند که ارتباط مثبتی بین تعداد مخمرهای سبز مشاهده شده در آزمون EFLM، مخمرهای زنده در آزمون میکروبی، مقدار گاز تولید شده در آزمون گازوگرافی و بالاخره حجم نان وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: مخمر نانوبی، زنده‌مانی، قدرت تولید گاز، میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس

### مقدمه

خاص است. اندازه‌گیری مقدار گاز تولیدی توسط مخمر نانوبی توسط محققین مختلفی انجام گرفته که به سنجش مقدار حجم و فشار گاز تولیدی پرداخته‌اند (Duns, 1988; Guillermo et al., 2009). همچنین در پژوهش‌های منتشر شده مقایسه روش‌های مختلف ارزیابی قدرت تولید گاز و فعالیت تخمیری مخمر نانوبی نیز صورت گرفته است (Kasaie et al., 2013; Borzani, 2004). استفاده از روش میکروبی برای مشاهده زنده‌مانی مخمرها براساس استفاده از محیط کشت‌های مخصوص انجام می‌پذیرد. ضمناً، تحقیقاتی که در مورد زنده‌مانی مخمر نانوبی صورت گرفته محدودتر از تحقیقاتی هستند که در مورد قدرت تولید گاز آنها انجام گرفته است.

محققان با استفاده از رنگ آمیزی با معرف متیلن بلو و به وسیله روش الکتروفورز به برقراری ارتباط بین فعالیت تولید گاز مخمر و قابلیت زنده‌مانی آن پرداختند. قابلیت زنده‌مانی مخمر یک مفهوم نسبی است، بدین معنی که سلول‌های مخمر

در کلیه روش‌های پخت نان، از مخمر برای ایجاد حجم، بهبود طعم، بهبود کیفیت گلوتن و افزایش قابلیت هضم نان حاصل استفاده می‌شود. ضرورت استفاده از مخمر به‌عنوان یک ترکیب کلیدی در صنعت نانوبی بر کسی پوشیده نیست. موضوع مهم در این رابطه توانایی تولید گاز و قابلیت زنده‌مانی 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 نتیجه تلاش آنها در دو بخش عمده آمده است. بخش نخست، بررسی مقدار تولید گاز دی اکسیدکربن توسط مخمر نانوبی، و بخش دوم مربوط به بررسی زنده‌مانی آنها با انجام آزمون‌های

\* نویسنده مسئول: peighamardoust@tabrizu.ac.ir

استفاده قرار گرفت (Peighambardoust *et al.*, 2010b). لذا در پژوهش حاضر، این روش به همراه تکنیک منحصر به فرد رنگ آمیزی همزمان سلول‌های مخمر برای بررسی زنده‌مانی و فعالیت آنها معرفی و مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط آن با آزمون‌های متداول مانند آزمون گازوگرافی، آزمون میکروبی و آزمون پخت نان بررسی گردید.

### مواد و روش‌ها

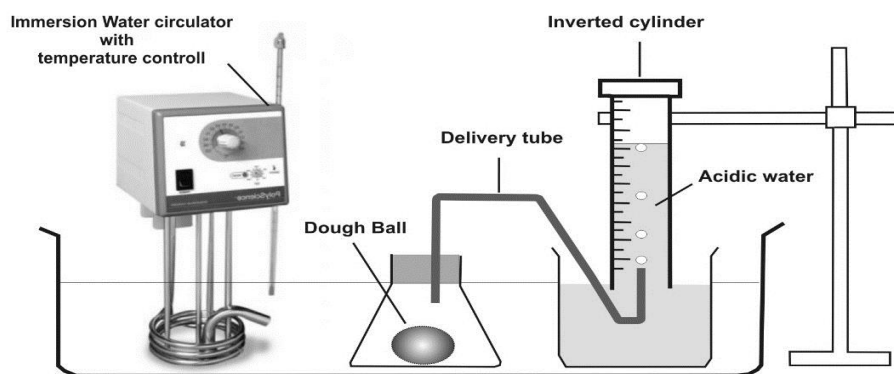
محلول‌های رنگ آمیزی فلورسین دی استات و اوانس بلو، محیط کشت YGC Agar (مرک آلمان)، سه نمونه مخمر خشک تجارتي، میکروسکوپ نوری اپی فلوروسانس (مدل E1000، شرکت نیکون ژاپن)، میکسر نانویی سیاره‌ای (شرکت سپه کار اصفهان)، فر پخت نان مجهز به محفظه‌های جداگانه تخمیر و پخت با قابلیت تزریق بخار فشرده (شرکت Voss آلمان) و دستگاه گازوگراف (شرکت آذر تجهیز آزما، تبریز) مورد استفاده قرار گرفت.

### آزمون میکروسکوپ اپی فلوروسانس

در کلیه آزمون‌های میکروسکوپی تصویربرداری با دوربین پیشرفته خنک شونده نیکون اکلیپس با قدرت تفکیک رنگ ۱۴ بیت به ازاء هر کانال (RGB) استفاده شد و تعداد سلول‌های مخمر رنگ آمیزی شده شمارش شدند (Peighambardoust *et al.*, 2010b). برای انجام آزمون ابتدا سوسپانسیون مخمری با رقت  $10^4$  تهیه و قطره‌ای از آن روی لام قرار گرفت. رنگ آمیزی با روش رنگ آمیزی مزدوج (همزمان) انجام گرفت. بدین صورت که روی سوسپانسیون مورد نظر یک قطره محلول فلورسین دی استات (FDA)  $0.02\%$  درصد و بلافاصله یک قطره محلول اوانس بلو  $0.1\%$  درصد افزوده و روی شیشه لام گسترده شد. این کار برای رنگ آمیزی سلول‌های مخمری زنده و مرده به صورت هم‌زمان انجام گرفته و مدت زمان ۱۰ دقیقه برای جذب و تثبیت رنگ به سلول‌های مخمری اختصاص داده شد. در اثر این نوع رنگ آمیزی و در زیر نور فلوروسانس مخمرهای زنده به رنگ سبز درخشان و مخمرهای مرده به رنگ قرمز در می‌آیند. از هر سوسپانسیون مخمری ۵ تصویر و از میدان‌های مختلف دید میکروسکوپی به صورت تصادفی گرفته شده و در نهایت شمارش سلول‌ها انجام گرفت و نتایج عددی سلول‌های شمارش شده بازاء هر تصویر به صورت میانگین بیان گردید (Thorn, 2016).

می‌توانند زنده باشند، اما فعال نباشند. توانایی سلول‌های مخمر برای رشد و تولید مثل، همان فعالیت تخمیری مخمر است که مهم‌تر از زنده بودن آن است (Grula *et al.*, 1985). آنجائی‌که گاز  $CO_2$  در طی تخمیر توسط مخمرها تولید می‌شود، اندازه‌گیری حجم گاز تولیدی می‌تواند ارزیابی مناسبی برای دستیابی به فعالیت تخمیری مخمر باشد. با این وجود، این روش نیز دارای معایبی است، از جمله اینکه مقدار 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 نیست، ولی در کنار روش‌های فشارسنجی و دستگاهی رایج به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bellidi *et al.*, 2008). در مطالعات میکروسکوپی روش رنگ آمیزی جدیدی ارائه شده که مبتنی بر استفاده از روش DAPI (۴ و ۶ دی آمینو، ۲ فنیل ایندول) و اوانس بلو و جستجوی فلورسانس است (Autio *et al.*, 1992) است. علاوه بر این محققان مذکور از دستگاه فرمانتوگراف نیز برای ارزیابی فعالیت تخمیری مخمر نانویی استفاده کرده و اظهار داشتند که میزان خطا در این روش حدود ۵٪ است. 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 سطح زنده‌مانی و بقای سلول‌های مخمری پرداخت. در این روش محققان بعد از 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 به صورت درصد بیان کنند (Rubenthaler *et al.*, 1980). در پژوهشی رشد و تولید گاز مخمرهای نانویی مختلف تجارتي با استفاده از سامانه طراحی شده برای اندازه‌گیری گاز  $CO_2$  مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن پژوهش نشان داد که روش گازسنجی به‌عنوان روشی کارآمد و سریع در مقیاس آزمایشگاهی برای غربالگری و شناسایی سویه‌های مناسب مخمر نانویی است (Golabi *et al.*, 2011). در پژوهش پیشین مؤلفان نیز انواع روش‌های متداول برای ارزیابی فعالیت تخمیری مخمرهای نانویی تجارتي موجود در بازار مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط خوبی بین روش‌های حجم سنجی با استفاده از گازوگراف و فشارسنجی با استفاده از فشارسنج و نهایتاً آزمون پخت (حجم و ارتفاع نان) به دست آمد (Kasaie *et al.*, 2013). میکروسکوپ نوری اپی فلوروسانس (EFLM) قبلاً در مطالعات مربوط به ارزیابی ریزساختار خمیر در آزمایشگاه ما با موفقیت مورد

منتقل و حجم گاز یا هوای جابجا شده در اثر انبساط خمیر در لوله مدرج در طی زمان یادداشت گردید. برای جلوگیری از انحلال دی اکسید کربن، آبی که استوانه مدرج در آن قرار گرفته بود با اسید استیک اسیدی شد (pH=4). در طول اندازه گیری دمای آب ثابت نگه داشته شد. منحنی تولید گاز (بر حسب میلی لیتر) به ازاء زمان (دقیقه) برای مخمرهای مختلف در طول زمان ۱۸۰ دقیقه رسم گردید (Peighambardoust *et al.*, 2010a).



شکل ۱. طرح شماتیک سیستم اندازه گیری فعالیت تخمیری با دستگاه گازوگراف

نمک طعام تصفیه شده بدون ید اضافه شد. تخمیر اولیه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، با رطوبت نسبی ۷۵٪ به مدت ۹۰ دقیقه انجام گرفت. بعد از چانه گیری خمیر در وزن های مساوی ۵۰ گرمی، تخمیر میانی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با رطوبت نسبی ۸۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه سپری شد. در نهایت لوله کردن دستی چانه های خمیر انجام و رول های حاصله در قالب های آلومینیومی کوچک به ابعاد ۳۰×۳۰×۷۰ میلی متر قرار گرفت و تخمیر نهایی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۹۰٪ به مدت ۴۵ دقیقه صورت گرفت. بلافاصله بعد از این مرحله، قالب ها در فر داغ که دمای آن قبلا به ۱۸۰ درجه سانتی گراد رسیده بود قرار گرفت. بخار آب داغ در محفظه فر بمدت ۱۰ ثانیه تزریق و سپس پخت در مدت زمان ۲۰ دقیقه انجام شد. بعد از خنک شدن قرص های نان، اندازه گیری حجم با روش حجم سنجی جابجایی دانه کلزا انجام شد. پس از انجام برش طولی قرص نان، ارتفاع آن با خط کش مدرج اندازه گیری گردید (Paredeslopez and Bushuk, 1982).

#### تجزیه و تحلیل آماری

به منظور انجام تحلیل های آماری از روش های آزمون t و تجزیه واریانس استفاده شد و معنی دار بودن یا نبودن تفاوت بین میانگین ها با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح آماری ۵

#### آزمون گازوگرافی

اندازه گیری افزایش حجم خمیر حاصل از تولید گاز توسط مخمر با دستگاه گازوگراف (شکل ۱) انجام گردید. خمیر مطابق فرمولاسیون روش AACC 89-01 تهیه شد. حدود ۱۰ گرم خمیر به صورت گلوله ای درآمده و در فلاسک مخصوص سیستم گازوگراف قرار داده شد. فلاسک در داخل بن ماری در آب با دمای کنترل شده ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته و خروجی گاز توسط لوله رابط به استوانه مدرج معکوس حاوی آب اسیدی

#### آزمون میکروبی

از آزمون میکروبی جهت بررسی فعال بودن مخمرها استفاده شد (Ranalli *et al.*, 2002). در این روش ۲۵ گرم مخمر با ۱۷۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. نیمی از سوسپانسیون در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت حرارت داده شد. قابلیت زنده ماندن این سوسپانسیون از طریق شمارش میکروبی بررسی شد. سپس سوسپانسیون مرده و سوسپانسیون فعال، توسط یک همزن مغناطیسی به آرامی و با نسبت های خاص با هم مخلوط شدند. برای شمارش سلول های مخمری نیز از این روش استفاده شد که سوسپانسیون مخمری با درصد های 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 سانتی گراد تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی (CFU) آن ها شمارش شدند. بدین صورت که تعداد کلنی های تشکیل شده در پلیت ها شمارش شده و در عکس رقت سوسپانسیون مورد نظر ضرب شدند. کلیه نمونه ها در دو تکرار کشت داده شدند.

#### آزمون پخت

برای پخت نان ۵۳۰ گرم آرد با ۲۸۰ میلی لیتر آب شهر مخلوط شده و ۱/۵٪ مخمر و ۱ درصد (با درصد وزنی بر اساس وزن آرد)

مقایسه تعداد واحدهای تشکیل دهنده هر سه مخمر مورد آزمون با درصد سوسپانسیونی زنده به مرده با نسبت ۱۰۰ به صفر نشان داده شده است. روند مشاهده شده در این آزمون مؤید نتایج آزمون‌های قبلی بوده و نشان داد هرچه میزان کلنی‌های تشکیل شده بیشتر باشد قدرت تولید گاز نیز بیشتری خواهد بود.

#### آزمون گازوگرافی

شکل ۳ نمودار تولید گاز CO<sub>2</sub> در طول زمان ۱۸۰ دقیقه برای سه نوع مخمر تجارتي مورد استفاده را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود میانگین حجم گاز تولیدی در پایان اندازه گیری برای مخمرهای A و B بیشتر از حجم گاز تولیدی مخمر C است. مخمر B تفاوت چندانی با مخمر A نشان نداد، اما میزان گاز تولیدی توسط مخمر C با دو مخمر دیگر تفاوت قابل ملاحظه‌ای نشان داد.

درصد تعیین گردید. عملیات آماری با نرم افزار SAS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت گرفت.

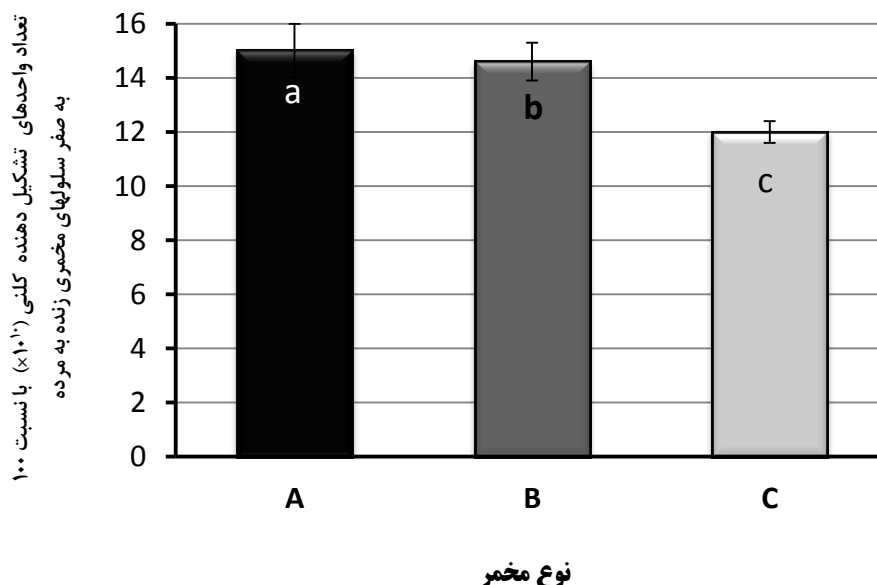
### نتایج و بحث

#### آزمون میکروبی

بر اساس جدول ۱ نتایج حاصل از شمارش سلولی (میانگین دو تکرار) و نیز نسبت سلول‌های زنده و مرده در سوسپانسیون مخمر ارتباط مستقیمی با هم نشان دادند. هرچه میزان زنده‌مانی سلول‌های مخمر در محیط تخمیر بیشتر باشد تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی نیز بیشتر خواهند بود. بنابراین ارتباط مستقیمی بین سلول‌های مخمری زنده و توانایی تولید گاز دی‌اکسیدکربن آنها وجود دارد. کشتن سلول‌های مخمری توسط حرارت این موضوع را تأیید کرد. مقدار CFU (در تمامی نسبت‌های سوسپانسیونی زنده به مرده) در مورد مخمر A بیشترین و در مورد مخمر C کمترین بدست آمد. در شکل ۲،

جدول ۱. شمارش CFU سلول‌های سه نوع مخمر با نسبت‌های مختلف سلول‌های زنده به مرده. نتایج جدول میانگین سه تکرار بعلاوه منهای انحراف معیار در سطح ۵ درصد آماری است.

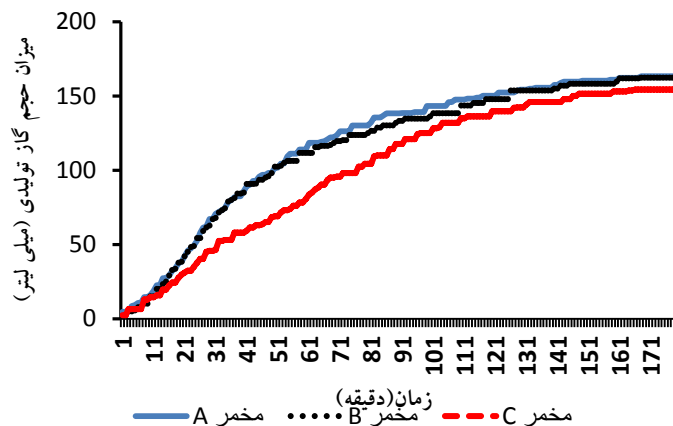
نسبت سلول‌های زنده به مرده	مخمر A (CFU/ml)	مخمر B (CFU/ml)	مخمر C (CFU/ml)
۱۰۰ به صفر	$15/0 \pm 1/0 \times 10^{10}$	$14/6 \pm 0/7 \times 10^{10}$	$12/0 \pm 0/4 \times 10^{10}$
۷۵ به ۲۵	$10/9 \pm 0/8 \times 10^{10}$	$10/2 \pm 0/7 \times 10^{10}$	$8 \pm 0/6 \times 10^{10}$
۵۰ به ۵۰	$6/9 \pm 0/9 \times 10^{10}$	$5/9 \pm 0/5 \times 10^{10}$	$3/9 \pm 0/6 \times 10^{10}$
۲۵ به ۷۵	$3/7 \pm 0/6 \times 10^{10}$	$3/1 \pm 0/4 \times 10^{10}$	$1/9 \pm 0/2 \times 10^{10}$
صفر به ۱۰۰	صفر	صفر	صفر



شکل ۲. مقایسه تعداد کلنی‌های تشکیل دهنده سه نمونه مخمر نانوایی. نتایج میانگین سه تکرار بوده و بازه‌های خطا معرف انحراف معیار آماری در سطح ۵ درصد است.

زمانی که ۱۰۰٪ سلول‌های مخمر زنده بودند، رخ داد. این بدین معنی است که هرچه میزان سلول‌های مخمری زنده بیشتر باشد تولید گاز دی اکسیدکربن نیز بیشتر خواهد بود.

بررسی نتایج حاصل از تأثیر درصد سلول‌های مخمری زنده بر حجم گاز دی اکسید کربن حاصله براساس جدول ۲، زمانی که ۵۰٪ سلول‌های مخمری A توسط حرارت کشته شدند، حدود ۴۰٪ کاهش حجم نسبت به



شکل ۳. مقایسه حجم گاز تولیدی سه مخمر در مدت زمان ۱۸۰ دقیقه (میلی لیتر/ دقیقه)

جدول ۲. حجم گاز CO<sub>2</sub> تولیدی خمیر با نسبت‌های مختلف مخمرهای زنده و مرده بر حسب ml در زمان‌های مختلف تخمیر\*

نسبت سلول‌های زنده به مرده مخمر			نسبت سلول‌های زنده به مرده مخمر
حجم گاز CO <sub>2</sub> (ml)			
۳ ساعت	۲ ساعت	۱ ساعت	
۱۶۶/۳۳ ± ۱۷	۱۴۸ ± ۱۲	۱۱۱/۶ ± ۱۳	۱۰۰ به صفر
۱۳۱ ± ۱۰	۱۲۰ ± ۱۱	۹۰ ± ۸	۲۵ به ۷۵
۸۲ ± ۷	۷۱ ± ۵	۵۳ ± ۶	۵۰ به ۵۰

\* نتایج میانگین دو تکرار بعلاوه منهای انحراف معیار در سطح ۵ درصد آماری است

و اوانس بلو انجام گرفت. ابعاد تصاویر ۸۵۰×۶۵۰ میکرون بوده که با بزرگ‌نمایی ۱۰× گرفته شده است.

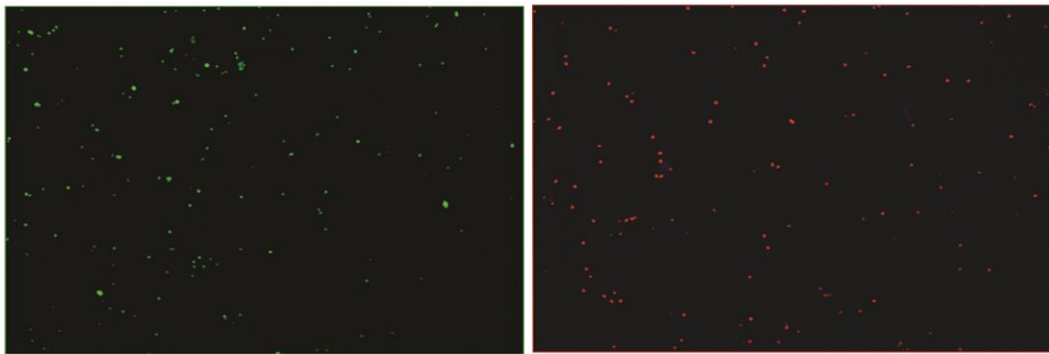
همان‌گونه که در شکل ۴ دیده می‌شود در سوسپانسیون مخمری مرده سلول‌ها تحت تأثیر معرف رنگی اوانس بلو به رنگ قرمز درآمد و پس از اعمال حرارت هیچ مخمر زنده‌ای (رنگ سبز) مشاهده نمی‌شود. در سوسپانسیون مخمری زنده نیز تمامی مخمرها زنده بوده و تحت تأثیر رنگ FDA به رنگ سبز درآمد و هیچ مخمر مرده (رنگ قرمز) که تحت تأثیر رنگ اوانس بلو قرار بگیرد، مشاهده نمی‌شود.

در مرحله بعد آزمون میکروسکوپی، نمونه‌های مربوط به نسبت‌های ۵۰ به ۵۰ و ۷۵ به ۲۵ (نسبت سلول‌های زنده به مرده) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در شکل ۵ نشان داده شده است. سلول‌های مخمری زنده با رنگ سبز و مرده با رنگ قرمز نمایان هستند.

نتایج اندازه‌گیری حجم گاز تولیدی توسط گونه‌های مختلف مخمر نانوائی تجارتي با دستگاه گازوگراف مشابه یافته‌های Golabi *et al.*, (2011) از این نظر بود که این روش آزمایشگاهی بخوبی توانست قدرت تخمیری مخمرهای نانوائی را تعیین و تفاوت آن را با گونه‌های دیگر مشخص کند. ضمناً نتایج روش گازوگرافی تأیید کننده نتایج سایر روش‌های میکروبی (شکل ۲) و دستگاهی دیگر بود (Peighamardoust *et al.*, 2010b).

#### نتایج آزمون میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس

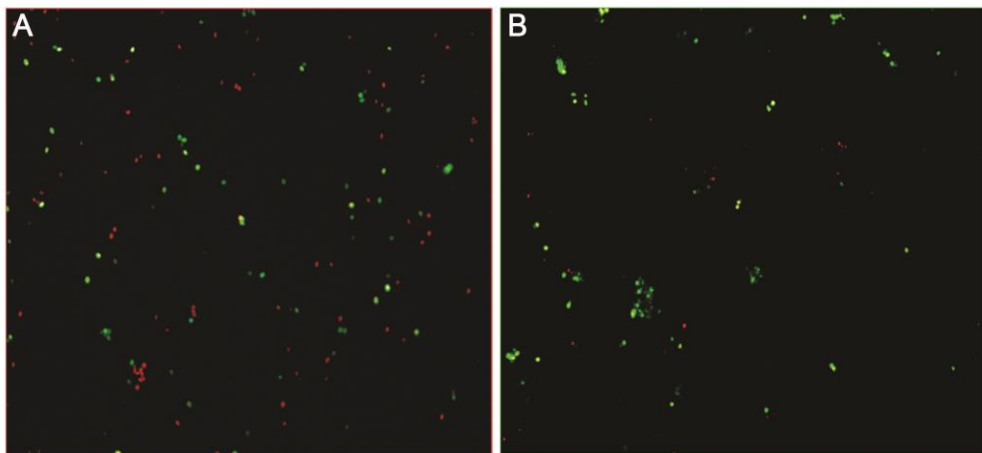
نتایج اولین مشاهده میکروسکوپی سلول‌های مخمر (۱۰۰ درصد زنده در مقابل ۱۰۰ درصد مرده توسط حرارت) در شکل ۴ آمده است. رنگ آمیزی با میکروسکوپ نوری با قابلیت اپی فلوروسنس به‌صورت رنگ آمیزی مزدوج (همزمان) (Double staining) توسط معرف‌های رنگی فلوروزین دی استات (FDA)



سوسپانسیون مخمر با 100 درصد سلولهای زنده

سوسپانسیون مخمر با 100 درصد سلولهای مرده

شکل ۴. سوسپانسیون مخمری ۱۰۰٪ مرده و ۱۰۰ درصد زنده با رنگ آمیزی همزمان توسط فلوروزین دی استات (FDA) و اوانس بلو. در مورد سلولهای مرده رنگ پذیری از محلول رنگی اوانس بلو و در مورد سلولهای زنده رنگ پذیری از محلول رنگی FDA می باشد.



نسبت سلول های زنده به مرده 50 به 50 درصد

نسبت سلول های زنده به مرده 75 به 25 درصد

شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ نوری اپی فلورسانس مربوط به سوسپانسیون مخمری به ترتیب با نسبت سلولهای زنده به مرده ۵۰ به ۵۰ (A) و ۷۵ به ۲۵ (B) با رنگ آمیزی همزمان توسط فلوروزین دی استات (FDA) و اوانس بلو، رنگ پذیری از هر دو محلول رنگی با بزرگنمایی ۱۰×.

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

همانگونه که انتظار می رفت تعداد مخمرهای زنده شمارش شده در سوسپانسیونهای مخمری ۱۰۰٪ زنده سه نمونه مخمرناوایی به ترتیب از A تا C از ۱۷۷/۸ درمورد مخمر A تا ۱۰۲/۲ درمورد مخمر C کاهش نشان داد. این نتایج کاملاً مطابق با نتایج حاصل از آزمونهای گازوگرافی (شکل ۲) و میکروبی (شکل ۳) است که نشان می دهد هرچند روش میکروسکوپی یک روش مشاهداتی می باشد اما با تکنیک مورد استفاده در این پژوهش نتایج آن به دقت روشهای کمی زمان بر (حدود چند ساعت برای روش گازوگرافی و روش مستقیم پخت نان) می باشد.

نتایج نشان داد که تکنیک EFLM با رنگ آمیزی مزدوج بخوبی توانست سلولهای زنده مخمری را از سلولهای مرده تشخیص داده و نسبت سلولهای زنده به مرده را نیز مشخص کند. لذا با تثبیت تکنیک مورد استفاده می توان در نمونههای مجهول مخمری، نسبت سلولهای زنده و مرده را با تکنیک میکروسکوپی مشاهده و شمارش کرد. لذا در مرحله بعد آزمون، تصاویر میکروسکوپی سه نمونه مخمر تجارتي (A، B و C) با روش فوق الذکر بدست آمد که در شکل ۶ نشان داده شده است. همانگونه که از این شکل دیده می شود مخمر A با تفاوت بسیار کمی از مخمر B، رنگ پذیری بیشتری داشته و سلولهای سبز مخمری زنده تعداد نسبتاً بیشتری از مخمر B نشان می دهند. مخمر B نسبت به مخمر C قوی تر بوده و مخمر C دارای تفاوت قابل ملاحظه ای با مخمرهای A و B از لحاظ شمارش تعداد سلولهای زنده دارد. برای کمی سازی نتایج

حجم و ارتفاع نان‌های تهیه شده از مخمرهای فوق در جدول ۴ آمده است. همانطور که ملاحظه می‌شود ارتفاع و حجم نان‌های حاصله از مخمرهای A تا C کاهش یافته است. همانطور که از آزمون‌های قبلی نیز معلوم شد، این امر به دلیل تعداد بیشتر سلول‌های زنده و فعال در مخمر A نسبت به مخمر B و آن‌هم نسبت به مخمر C می‌باشد. 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.

جدول ۴. مقایسه ارتفاع نان‌های حاصل از سه نمونه مخمر\*

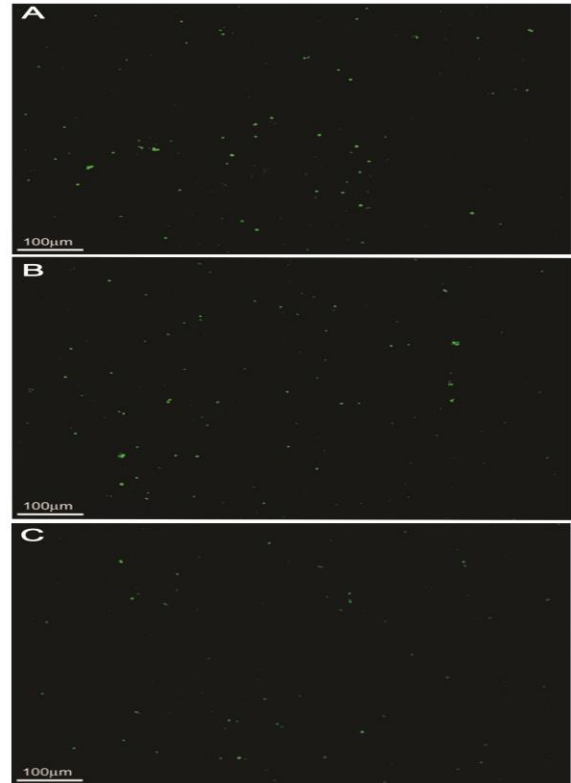
نام مخمر	ارتفاع نان حاصله (سانتیمتر)	حجم نان حاصله (سانتیمتر مکعب)
A	۴/۷۲±۰/۳۵	۱۳۲/۲۲±۱۰/۰۳
B	۴/۶۱±۰/۳۷	۱۲۷/۵۵±۶/۳۴
C	۳/۸۱±۰/۳	۱۰۸/۳۳±۶/۲۱

\* نتایج حاصل با سه تکرار بدست آمده اند

مقایسه آزمون‌های انجام یافته و نتایج حاصله نتایج حاصل از آزمون‌های انجام گرفته روی سه مخمر A و B و C در جدول ۵ با هم مقایسه شده‌اند. نتایج در مورد تمام آزمون‌ها یکسان بوده و حاکی از قدرت بیشتر مخمر A نسبت به دو مخمر دیگر بوده و نشان می‌دهد که هر چه میزان حجم گاز تولیدی در آزمون گازوگرافی و میزان واحدهای تشکیل دهنده کلنی در آزمون میکروبی و تعداد سلول‌های زنده و فعال در آزمون میکروسکوپی 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 تاثیر محلول رنگی FDA به رنگ سبز در می‌آیند بیشتر بوده و هر چه این تعداد بیشتر باشد فعالیت تخمیری مخمر نانواپی 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.

جدول ۵. مقایسه کلی آزمون‌های انجام یافته

مخمر C	مخمر B	مخمر A	آزمون
۱۵۴/۳۳±۱/۴	۱۶۲/۳۳±۱/۴	۱۶۳/۳۳±۱/۹	گازوگرافی (ml)
۱۲×۱۰ <sup>۱۰</sup>	۱۴/۶×۱۰ <sup>۱۰</sup>	۱۵×۱۰ <sup>۱۰</sup>	میکروبی (cfu/mg)
۱۰۲/۲±۸/۹۷	۱۶۳/۲±۷/۹۸	۱۷۷/۸±۷/۳۶	میکروسکوپی
۱۰۸/۳۳±۶/۲۱	۱۲۷/۵۵±۶/۳۴	۱۳۲/۲۲±۱۰/۰۳	حجم نان (cm <sup>3</sup> )
۳/۸۱±۰/۳	۴/۶۱±۰/۳۷	۴/۷۲±۰/۳۵	ارتفاع نان (cm)



شکل ۶. مقایسه نتایج میکروسکوپی مربوط به سوسپانسیون مخمرهای تجاری A، B و C با رنگ آمیزی مزدوج فلوروزین دی استات (FDA) و اوانس بلو با بزرگ‌نمایی ۱۰× که سلول‌های زنده مخمر به رنگ سبز درآمده اند

جدول ۳. شمارش تعداد سلول‌های مخمری زنده در سوسپانسیون‌های مخمری هر سه تیمار\*

نام مخمر	تعداد سلول‌های شمارش شده در میدان دید میکروسکوپی
A	۱۷۷/۸±۷/۳۶
B	۱۶۳/۲±۷/۹۸
C	۱۰۲/۲±۸/۹۷

\* نتایج حاصل با پنج تکرار بدست آمده اند.

### نتایج حاصل از آزمون پخت (حجم و ارتفاع نان های حاصله)

از نتایج آزمون‌های گازوگرافی، میکروبی و میکروسکوپی معلوم شد که فعالیت تخمیری مخمرهای نانواپی به ترتیب از مخمر A تا مخمر C رفته رفته کمتر شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری

## نتیجه گیری

با بررسی نتایج حاصل از مطالعات میکروبی، میزان قدرت حجم دهی، مطالعات میکروسکوپی از دیدگاه زنده مانی مخمر نانوایی و نیز آزمون پخت، می توان اظهار داشت که رابطه مستقیم بین درصد زنده مانی مخمرها در محیط تخمیر، قدرت تولید گاز آنها و همچنین عملکرد نانوایی مخمر ساکارومایسس سرویسیا از نظر تکنولوژیکی وجود دارد. روش میکروسکپ اپی فلورسانس با رنگ آمیزی مزدوج با دو محلول رنگی فلورزین دی استات و اوانس

بلو بکار گرفته شده در این پژوهش به خوبی توانست تعداد سلول های زنده و مرده مخمری را به طور همزمان مشخص و نسبت آنها در نمونه های مختلف مخمرهای تجارتي را آشکار سازد. لذا با استفاده از این روش می-توان به پیش بینی قدرت عملکردی مخمر نانوایی در محیط تخمیر پرداخت و بدین ترتیب این روش به عنوان جایگزین روش های متداول طولانی مدت در ارزیابی زنده مانی و عملکرد تکنولوژیکی مخمر نانوایی مطرح می شود.

## REFERENCES

- 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.
- Bellidi G., Martin G., Harry D. & John H. (2008). Use of a pressuremeter to measure the kinetics of carbon dioxide evolution in chemically leavened wheat flour dough. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56: 9855-9986.
- Borzani W. (2004). Measurement of the gassing power of bakers' yeast: correlation between the dough volume and the incubation time. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(2):213-217.
- Paredeslopez O., Bushuk W. 1982. Development and undevelopment of wheat dough by mixing - microscopic structure and its relations to bread-making quality. *Cereal Chemistry*, 60: 24-27.
- Dobbles M., Peleg, R.E. & Mudgett B. (1982). Some physical characteristics of active dry yeast. *Powder Technology*, 32: 63 - 69.
- Duns F. (1988). Multi fermentation screening system (MFSS): computerized simultaneous evaluation of carbon dioxide production in twenty-four yeasted broths or doughs. *Journal of Microbiological Methods*, 8:303-314.
- Golabi, M., Nahvi, I., Tavasoli, M., Mobini Dehkordi, M. 2010. Assessment of stress resistance of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for designing selection media. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*. 4, 1-8.
- 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.
- Grula 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(1):29-32.
- Kasaie Z., Peighambardoust S.H., Dadpour M.R., Moosavy M.H. & Shakouie Bonab E. (2013). Comparing different methods for evaluating gassing power and fermentation activity of baker's yeast. *Journal of Food Research*, 22(4):431-442 (In Farsi).
- Peighambardoust S.H., Fallah E., Hamer R.J. & van der Goot A.J. (2010a). Aeration of bread dough influenced by different way of processing. *Journal of Cereal Science*, 51: 89-95.
- Peighambardoust S.H., Dadpour M.R. & Dokouhaki M. (2010b). Application of epifluorescence light microscopy (EFLM) to study the microstructure of wheat dough: a comparison with confocal scanning laser microscopy (CSLM) technique. *Journal of Cereal Science*, 51:21-27.
- Ranalli G., Iorizzo M., Lustrato G. Zanardini E. and Grazia L. 2002. Effects of low electric treatment on yeast microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 877-883.
- 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.
- Thorn. K. (2016). A quick guide to light microscopy in cell biology. *Molecular Biology of the Cell*. 27(2): 219-222.