www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۶، جلد ۶، شماره ۲، صفحات ۱۲۶-۱۱۵
Doi: 10.22101/JRIFST.2017.09.02.621

JRIFST

پژوهشکده علوم و صنایع غذایی

تأثیر خمیرترش خشک‌شده با روش پاششی بر تشکیل شبکهٔ گلوتن با مطالعهٔ ریزساختار خمیر

آیلا آیرملو[۱]، پریسا جعفریان[۲*]، سیدهادی پیغمبر دوست[۳]

۱- کارشناس ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده پردیس بین‌الملل، دانشگاه تبریز، ایران
۲- دانشجوی دکتری مهندسی علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
* نویسندهٔ مسئول (parisajafarian@yahoo.com)
۳- دانشیار، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۸

واژه‌های کلیدی
خمیر
خمیرترش خشک
ریزساختار
گلوتن

چکیده

خمیرترش سیستم بیولوژیکی پیچیده‌ای است که شامل اجزایی نظیر کربوهیدرات‌های غله‌ای، پروتئین‌ها، باکتری‌های اسیدلاکتیک، مخمرها و آنزیم‌های مختلف می‌باشند. خمیرترش نقش کلیدی در بهبود طعم، بافت، خصوصیات تغذیه‌ای و زمان ماندگاری فراورده‌های نانوایی دارد. در این مطالعه از خمیرترش خشک‌شده به روش پاششی که حاوی ۳ نوع باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کورواتوس* و *لاکتوباسیلوس پارالیمانتاریوس* بود به میزان ۱۵ درصد استفاده و تأثیر آن بر تشکیل شبکهٔ گلوتنی و ریزساختار خمیر با استفاده از میکروسکوپ نوری اپی‌فلورسنس مطالعه گردید. باتوجه‌به نتایج حاصله از مشاهده‌های میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی هم‌زمان نمونه‌های خمیر با رودامین ۰/۱ درصد و فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) ۱ درصد تهیه‌شده در حلال دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) مشخص شد که شبکهٔ گلوتنی به‌صورت پیوسته و لایه‌لایه است و آثاری از تخریب دیده نشد. بنابراین می‌توان گفت با استفاده از روش اسیدی‌کردن بیولوژیکی (استفاده از میکروارگانیسم‌ها) در طی تخمیر خمیرترش، در خمیر مقدار ترکیبات مولد عطروطعم بیشتری تولید شده و شبکهٔ گلوتنی به خوبی تشکیل شد.

مقدمه

نان به‌عنوان کالای اساسی و ضروری دارای اهمیت ویژه‌ای در سبد مصرفی خانوارها بوده است و غذای اصلی و پایهٔ بسیاری از مردم در کشورهای جهان را تشکیل می‌دهد. روزانه قسمت اعظم انرژی، پروتئین، املاح معدنی، ویتامین‌های گروه ب (تیامین، ریبوفلاوین و نیاسین) مورد نیاز بدن را تأمین می‌نماید. در گذشته در واحدهای سنتی طبخ نان به‌ویژه در شرایطی که تعداد نانوایی‌ها کم و مشتریان آن زیاد بود، جهت صرفه‌جویی در زمان، افزایش سرعت و سهولت انجام کار از مادهٔ شیمیایی بی‌کربنات سدیم استفاده می‌شد که این امر همچنان ادامه دارد و متأسفانه از لحاظ بهداشتی و تأثیر بر سلامت افراد جامعه دارای آثار سوئی می‌باشد (امین‌پور، ۱۳۷۴). به‌عنوان یک تعریف، خمیرترش عبارت است از یک خمیر متشکل از آرد غلات (و سایر مواد درصورت نیاز)، مایعات و میکروارگانیسم‌هایی نظیر باکتری‌های اسیدلاکتیک و مخمرها در حالت فعال آنها که به‌ترتیب مسئول اسیدی‌کردن و ورآمدن (انبساط) خمیر می‌باشند (Ananta *et al.*, 2005).

مطالعه‌های میکروبیولوژیکی نشان می‌دهند که بیش از ۵۰ گونه از باکتری‌های اسیدلاکتیک (عمدتاً

جنس *لاکتوباسیلوس*)[1] و بیش از ۲۰ گونه از انواع مخمر به‌ویژه گونه‌های جنس *ساکارومایسس*[2] و کاندیدا[3] در سیستم خمیرترش حضور دارند. برای فعالیت مناسب در سیستم خمیرترش بایستی نسبت باکتری‌های اسیدلاکتیک به مخمر ۱۰۰ به ۱ باشد (Bache *et al*., 1998). باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در خمیرترش می‌توانند از فلور طبیعی آرد، آلودگی‌های موجود در مخمر نانوایی و یا محیط پخت نشئت گرفته باشند که غیر از جنس *لاکتوباسیلوس*، جنس‌های *پدیوکوکوس*[4]، *انتروکوکوس*[5]، *لاکتوکوکوس*[6] و *لوکونوستوک*[7] را نیز شامل می‌شود (Augustin *et al*., 2008). فعالیت باکتری‌های اسیدلاکتیک در سیستم خمیرترش باعث ایجاد شرایط اسیدی و تجزیهٔ پروتئین‌ها می‌شود. تجزیهٔ پروتئین طی تخمیر خمیرترش یک پدیدهٔ کلیدی است که کیفیت نان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. واکنش‌های پروتئولیتیک اسیدهای آمینه‌ای آزاد می‌کند که پیش‌سازهای عطروطعم می‌باشند. نتیجهٔ دیگر پروتئولیز تغییر در رئولوژی خمیر و بافت نان است (Bahraei *et al*., 2004).

بیشتر مطالعه‌ها روی ساختار شبکه گلوتن در خمیر، آرد و نان گندم با استفاده از میکروسکوپ نوری، الکترونی‌روبنده[8] (SEM) و روبندهٔ محیطی[9] (ESEM)، و کونفوکال لیزری[10] (LSCM) انجام گرفته است که از میان آنها می‌توان به موارد زیر اشاره نمود. بررسی ریزساختار خمیرهای مختلف و گلیادین و گلوتنین استخراج‌شده از آنها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبنده صورت گرفت (Herman *et al.,* 1998). همچنین مطالعهٔ ساختار شبکهٔ گلوتنی در خمیرهای در معرض تنش و اثر مقادیر مختلف هیدراسیون روی ساختار خمیر با میکروسکوپ الکترونی روبندهٔ محیطی بررسی شد (Ananta *et al*., 2005). همچنین پیغمبر دوست و همکاران (۱۳۷۵) ریزساختار خمیرهای ZD[11] و خمیرهایی که در معرض نیروهای برشی قرار گرفته بودند و ذرات گلوتنین موجود در این خمیرها را با میکروسکوپ کونفوکال لیزری بررسی کردند (IDF, 1993). هزینه‌های بالا و پیچیدگی‌های دستگاهی روش‌های فوق، استفاده از آنها را در بررسی ریزساختار خمیر، محدود می‌نماید. در روش جایگزین که برای اولین بار در این مطالعه ارائه گردیده است از میکروسکوپ نوری اپی‌فلورسنس (EFLM) برای مطالعهٔ ریزساختار خمیر براساس مشاهدهٔ هم‌زمان شبکهٔ گلوتنی و فاز نشاسته ازطریق رنگ‌آمیزی مزدوج طراحی گردیده است.

همچنین اسیدیفیکاسیون القاءشده توسط میکروارگانیسم‌های خمیرترش و نیز تأثیر افزودن خمیرترش خشک‌شده با روش پاششی بر تغییرات شبکهٔ گلوتنی خمیر و اثرات متعاقب آن بر ریزساختار را با استفاده از میکروسکوپ EFLM بررسی شده است.

در پژوهش حاضر اسیدیفیکاسیون القاءشده توسط میکروارگانیسم‌های خمیرترش و نیز تأثیر افزودن خمیرترش خشک‌شده با روش پاششی بر تغییرات شبکهٔ گلوتنی خمیر و اثرات متعاقب آن بر ریزساختار را با استفاده از میکروسکوپ EFLM بررسی شد و مطالعهٔ ریزساختار خمیر براساس مشاهدهٔ هم‌زمان شبکهٔ گلوتنی و فاز نشاسته ازطریق رنگ‌آمیزی مزدوج طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده برای تهیهٔ خمیر

آرد روشن با درجهٔ استخراج ۷۸ درصد، از شرکت آرد تبریزکار (تبریز) تهیه شد.

مواد شیمیایی

سرم فیزیولوژی، هیدروکسید سدیم، ردامین B، FITC، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) که همه ساخت شرکت مرک آلمان بود.

[1] *Lactobacillus*
[2] *Saccharomyces*
[3] Candida
[4] *Pediococcus*
[5] *Enterococcus*
[6] *Lactococcus*
[7] *Leuconostoc*
[8] Scanning Electron Microscope
[9] Environmental Scanning Electron Microscope
[10] Laser Scanning Confocal Microscope
[11] Zero-mechanical energy Developed Dough

سویه‌های باکتریایی

باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[1] ۱۰۵۸ (ATCC)[2] (باکتری *هتروفرمنتاتیو* اختیاری) و باکتری *لاکتوباسیلوس کورواتوس*[3] ۱۶۵۵ ATCC (باکتری *هتروفرمنتاتیو* اجباری) و *لاکتوباسیلوس پارالیمانتاریوس*[4] که قبلاً جداسازی‌شده از خمیرترش نان‌های سنتی استان آذربایجان شرقی (Golshan Tafti *et al*., 2013) به‌صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران (PTCC)[5] تهیه شد.

محیط کشت میکروبی

محیط کشت MRS broth ساخت شرکت مرک آلمان، پودر شیر بدون چربی[6] از شرکت پگاه آذربایجان شرقی تهیه شد.

روش‌ها

تهیهٔ سوسپانسیون باکتریایی برای تلقیح به خمیرترش

سویه‌های *لاکتوباسیلوس* جداشده از خمیرترش‌های سنتی (*لاکتوبایلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کورواتوس*، *لاکتوباسیلوس پارالیمنتاریوس*) دو مرتبه در محیط مایع MRS، تحت شرایط هوازی و در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت و گرم‌خانه‌گذاری شدند. تودهٔ سلولی با سانتریفیوژکردن (دور g × ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد)، شست‌وشوی مجدد با آب‌مقطر استریل و تعلیق‌کردن در آب‌مقطر استریل به‌دست‌آمده از تودهٔ سلولی جهت تهیهٔ خمیرترش استفاده شد (Robert *et al*., 2006).

تهیه و تخمیر خمیرترش تازه

نمونه‌های خمیرترش مایع با استفاده از کشت‌های باکتریایی فعال *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پارالیمانتاریوس* و *لاکتوباسیلوس کورواتوس* و مخلوط این دو به‌عنوان آغازگر به‌طور جداگانه تهیه شد. مقدار خاکستر آرد ازجمله فاکتورهای مهم در تعیین خصوصیات خمیرترش و نان حاصله می‌باشد، به‌طوری‌که در محدودهٔ خاکستر ۰/۶۵ درصد رابطهٔ خطی بین میزان خاکستر آرد و تولید اسید و ترکیبات فرار وجود دارد. درصورت بالابودن درصد استخراج آرد، میزان مواد مغذی آرد افزایش‌یافته و به‌دلیل وجود اسیدفیتیک در لایهٔ آلرون، ظرفیت بافری آرد افزایش می‌یابد. این فاکتورها باعث تحریک فعالیت بیوشیمیایی و رشد میکروفلور خمیرترش و درنتیجه تولید اسیدها و ترکیبات طعمی دیگر می‌شود (Hansen, 1994). سوبسترای تشکیل‌شده از آرد با درصد استخراج ۹۸ درصد و آب با راندمان برابر ۳۵۰ خمیر با سه نوع آغازگر اشاره‌شده و به میزان 10^8 باکتری به‌ازای هر گرم خمیر تلقیح شد. فرایند تخمیر در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ ساعت در یک انکوباتور شیکردار در ۱۵۰ دور در دقیقه انجام شد (Robert *et al*., 2006).

تهیهٔ خمیرترش خشک

خمیرترش تازه تولیدشده توسط پمپ به محفظهٔ داخلی دستگاه خشک‌کن پاششی (شکل ۲-۱، ساخت شرکت مهام صنعت نیشابور) واقع در کارگاه تکنولوژی غلات خلعت‌پوشان انتقال داده شد. دستگاه مجهز به اتومایزر چرخشی و فن با حداکثر ۲۴۸۰ دور بر دقیقه بود. خشک‌کردن با جریان هوای موازی و دمای هوای ورودی ۱۸۵-۱۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد و دمای هوای خروجی ۹۵-۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. پودر خمیرترش پس از بسته‌بندی در کیسه‌های نایلونی در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد تا مرحلهٔ تهیهٔ خمیر نگهداری شد (پیغمبردوست و همکاران، ۱۳۹۳).

تهیهٔ خمیر با استفاده از پودر خمیرترش خشک در این پژوهش ۵ تیمار به شرح زیر مورد بررسی قرار می‌گیرد. یک تیمار نمونهٔ شاهد می‌باشد، خمیری که بدون استفاده از خمیرترش تهیه شده است. تیمار دوم، خمیر تهیه‌شده با استفاده از خمیرترش معمولی (خمیر سنتی) به میزان ۲۰ درصد می‌باشد. ۳ تیمار دیگر خمیرهای تهیه‌شده از خمیرترش خشک‌شده حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس*

[1] *Lactobasilus plantarum*
[2] American Type Culture Collection
[3] *Lactobasilus Curvatus*
[4] *Lactobasilus Paralimentarius*
[5] Persian Type Culture Collection
[6] Skim Milk

پارالیمانتاریوس و *لاکتوباسیلوس کورواتوس* بود که از هرکدام به میزان ۱۵ درصد به خمیر اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد در آون استراحت داده شد سپس همهٔ تیمارها در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد به‌منظور بررسی تغییرات انجام‌شده روی شبکهٔ گلوتنی و ریزساختار خمیر نگهداری شد (پیغمبردوست و همکاران، ۱۳۹۳).

مشاهدهٔ ریزساختار خمیرهای تهیه‌شده با خمیرترش

نمونه‌های خمیر منجمدشده توسط مایکروتوم دستی در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد برش داده شدند که به‌موجب آن یک سطح خیلی صاف برای مشاهده‌های میکروسکوپی قابل دسترس می‌گردد. تکه‌های خمیر حاصله با ضخامت ۵-۳ میلی‌متر روی لام‌های شیشه‌ای گرفته و مخلوطی با نسبت ۱:۱ از محلول‌های رنگی یادشده برای رنگ‌آمیزی نمونه‌های خمیر استفاده شد و سپس با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس بررسی نمونه‌ها انجام شد.

نمونه‌های خمیر نسبت ۱:۱ از FITC ۱ درصد تهیه‌شده در حلال DMSO و رادامین B ۰/۱ درصد به‌صورت رنگ‌آمیزی مزدوج یا توأم[1] رنگ‌آمیزی‌شده و پس از سپری‌شدن مدت زمان ۱ ساعت به‌منظور پخش رنگ در نمونه‌ها، مشاهده‌های میکروسکوپی انجام شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

در این تحقیق کلیهٔ آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با رویهٔ مدل‌های خطی تعمیم یافته (GLM)[2] نرم‌افزار SAS مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند. آزمون مقایسهٔ میانگین‌ها با روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. برای بررسی داده‌های حاصل از مشاهده‌های میکروسکوپی از نرم‌افزار Image Analysis استفاده شد.

نتایج و بحث

خصوصیات فیزیکوشیمیایی پودر خمیرترش

خصوصیات فیزیکوشیمیایی پودر خمیرترش (حاوی آغازگر باکتری *لاکتوباسیلوس پارالیمنتاریوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کورواتوس*) در جدول (۱) آمده است. مقدار pH و TTA کلیهٔ پودرهای خمیرترش به‌ترتیب در دامنهٔ ۳/۵۶- ۳/۲۸ و ۵۹/۲- ۴۷/۵ به‌دست آمد. خصوصیات پودر بر تغییرات پودر حین نگهداری و فرایندها تأثیرگذار است و خصوصیات شیمیایی مخصوصاً اسیدیته، ویژگی‌های تکنولوژیکی محصول را نشان می‌دهد. اسیدیتهٔ پودرهای خمیرترش می‌تواند در دامنهٔ ۶۰- ۱۵ (میلی‌لیتر سود ۰/۱ نرمال مصرفی بر ۱۰ گرم نمونه) یا ۲۲۰- ۴۰ (kam *et al.,* 2006) بسته به فرایند تولید خمیرترش، مواد اولیهٔ مصرفی و تکنیک خشک‌کردن قرار گیرد. نوع آرد تأثیر قابل توجهی بر خصوصیات اسیدی‌شدن خمیرترش و خواص نان خمیرترش تولیدی دارد. مقدار اسید و ترکیبات طعمی در خمیرترش تهیه‌شده از آرد با درجهٔ استخراج بالا (با مقدار خاکستر ۱/۸ درصد) نسبت به خمیرترش تهیه‌شده از آرد با درصد خاکستر ۰/۶۶ درصد، بالاتر بود (Hansen, 1994). بنابراین به‌دلیل اینکه خمیرترش در این تحقیق از آرد کامل تهیه شده بود، مقدار pH برای پودرهای خمیرترش نسبتاً پایین بود. میزان رطوبت و فعالیت آبی پودرهای خمیرترش به‌ترتیب در محدودهٔ ۴/۴۲-۳/۲۷ درصد و ۰/۱۸-۰/۱۶ بود. مقدار رطوبت و فعالیت آبی فاکتورهایی مهم برای پایداری پودرها در حین نگهداری می‌باشند. در مورد پودرهای غذایی حاوی پروبیوتیک، فعالیت آبی باید زیر ۰/۲۵ درصد و مقدار رطوبت زیر ۵ درصد برای تضمین پایداری حین نگهداری باشد (Piazza *et al.*, 1995). پودرهای خمیرترش حاوی حدوداً ۱/۹ درصد خاکستر بودند. علت اصلی بالابودن مقدار خاکستر پودرها استفاده از آرد با درصد استخراج بالا (۹۸ درصد) برای تولید خمیرترش بود. نوع آرد مورد استفاده در تهیهٔ خمیرترش یک فاکتور مهم و تأثیرگذار بر ویژگی‌های خمیرترش و نان می‌باشد. با افزایش درصد استخراج آرد مقدار مواد تغذیه‌ای مانند ویتامین B و مواد معدنی خمیرترش افزایش می‌یابد (Bahraei *et al.*, 2004). غلظت لاکتیک‌اسید تهیه‌شده از آرد کامل ۳۰ تا ۵۰ درصد بالاتر از آردهای با درجهٔ استخراج پایین‌تر بود. لاکتیک‌اسید و استیک‌اسید ترکیبات طعمی مهم در نان گندم هستند (Wilson *et al.*, 1997).

[1] Double staining
[2] General Linear Model

جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی پودرهای خمیرترش حاوی کشت‌های آغازگر *لاکتوباسیلوس*

پودر خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس*	pH	TTA اسیدیته (میلی‌لیتر سود مصرفی)	فعالیت آبی (aw)	رطوبت (درصد)	خاکستر (درصد)	دانسیتهٔ حجمی (گرم/سانتی متر مکعب)	قابلیت رطوبت‌پذیری (ثانیه)	قابلیت تعلیق‌شدن (درصد)
کورواتوس	۳/۵۶^{b}	۴۷/۵^{a}	۰/۱۶۲^{c}	۳/۲۷^{a}	۱/۸۸^{a}	۶۴۱^{a}	۴۸/۶۶^{a}	۳۰/۱۹^{a}
پلانتاروم	۳/۵۳^{b}	۴۸/۲^{b}	۰/۱۸۰^{a}	۴/۴۲^{b}	۱/۸۷^{a}	۶۱۲^{bc}	۵۲^{b}	۲۹/۱^{b}
پارالیمنتاریوس	۳/۲۸^{a}	۵۹/۲^{c}	۰/۱۶۰^{c}	۳/۷۱^{c}	۱/۹^{b}	۶۱۰^{c}	۶۲^{c}	۲۸/۸^{b}

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند ازنظر آزمون دانکن در سطح آماری ۹۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

دانسیتهٔ حجمی یک فاکتور مهم است که می‌تواند بر خصوصیات فیزیکی پودر مانند قابلیت تعلیق‌شدن، رطوبت‌پذیری[1] و قابلیت فوری‌بودن تأثیرگذار باشد. فاکتورهای خشک‌کردن، نوع پودرکردن و همچنین توزیع اندازهٔ ذرات و شکل و حالت پودر نقش مهمی در مقدار دانسیتهٔ حجمی نهایی پودر دارند (Shinohara *et al.*, 2008). دانسیتهٔ حجمی پودرهای خمیرترش حدوداً ۰/۶ گرم بر سانتی‌متر مکعب بود که در حد شیرخشک بدون چربی می‌باشد. در هنگام مخلوط‌کردن، حمل‌ونقل، ذخیره‌سازی و بسته‌بندی مواد غذایی نظیر انواع پودرها و آردها دانستن چگالی توده بسیار حائز اهمیت است. وقتی چنین موادی درون ظرف ریخته می‌شوند حجم زیادی از فضای اشغال‌شده توسط مادهٔ غذایی را هوا تشکیل می‌دهد. بنابراین، چگالی تودهٔ مواد غذایی بستگی به عوامل مختلفی نظیر چگالی واقعی، شکل هندسی، اندازه، خواص سطحی، مقدار رطوبت و روش اندازه‌گیری دارد. بنابراین، به‌خوبی می‌توان دریافت که پیچیدگی عوامل مؤثر بر چگالی حجمی نسبت به چگالی واقعی بیشتر است (Kuktaite *et al.*, 2004).

آنالیز میکروبی پودر خمیرترش

پودرهای خمیرترش از لحاظ وجود *لاکتوباسیلوس‌ها* نیز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج شمارش تعداد کل *لاکتوباسیلوس‌ها* در پودرهای خمیرترش در جدول (۲) آورده شده است. جمعیت باکتریایی اولیهٔ سوسپانسیون خمیرترش تولیدی که به آرد برای تولید خمیرترش افزوده شد $۱۰^{۸}$ واحد کلونی در هر گرم بود. خشک‌کردن پاششی باعث کاهش تعداد کل *لاکتوباسیلوس‌های* خمیرترش و رسیدن جمعیت میکروبی آنها به $۱۰^{۵}$×(۸/۰۷-۱/۱۷) واحد کلونی در هر گرم در پودر خمیرترش شد. باکتری‌های اسیدلاکتیک در معرض گرما و آسیب‌های دهیدراسیون حین خشک‌کردن پاششی قرار گرفتند. نوع گونهٔ باکتریایی و دمای هوای خروجی مهم‌ترین فاکتورهای تأثیرگذار بر بقای باکتری‌ها هستند (Shinohara *et al.*, 2008). در این پژوهش جهت کاهش محتوای رطوبتی پودر خمیرترش به زیر ۵ درصد و درنتیجه حصول قابلیت نگهداری بالاتر آن، دمای هوای خروجی خشک‌کن در ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم شد، که این دما احتمالاً باعث مرگ سلولی باکتری‌ها شده است. چند محقق از بقای پایین میکروبی در دمای هوای خروجی ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد را گزارش کرده‌اند (Meuser *et al.*, 1995).

جدول ۲ - نتایج شمارش باکتری پودرهای خمیرترش حاوی کشت‌های آغازگر *لاکتوباسیلوس*

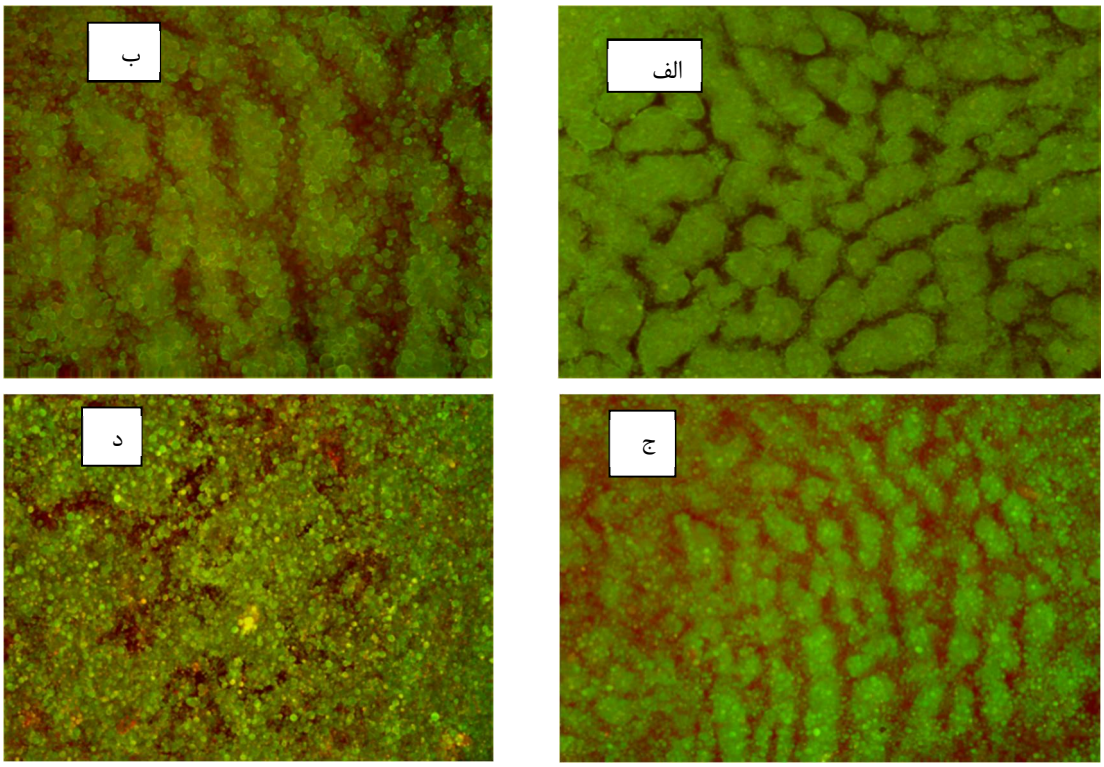
پودرهای خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس*	تعداد کل *لاکتوباسیلوس‌ها* (کلونی در هر گرم)
کورواتوس	$۱۰^{۵}$ × ۱/۱۷
پلانتاروم	$۱۰^{۵}$× ۸/۰۷
پارالیمنتاریوس	$۱۰^{۵}$× ۳/۶۹

نتایج مشاهده‌های ریزساختاری نمونه‌های خمیر تهیه‌شده با پودرخمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس پارالیمنتاریوس*

تفاوت‌های ریزساختاری خمیر رنگ‌آمیزی‌شده با FITC ۱ درصد و ردامین B ۰/۱ درصد در شکل (۱)

[1] Hygroscopicity

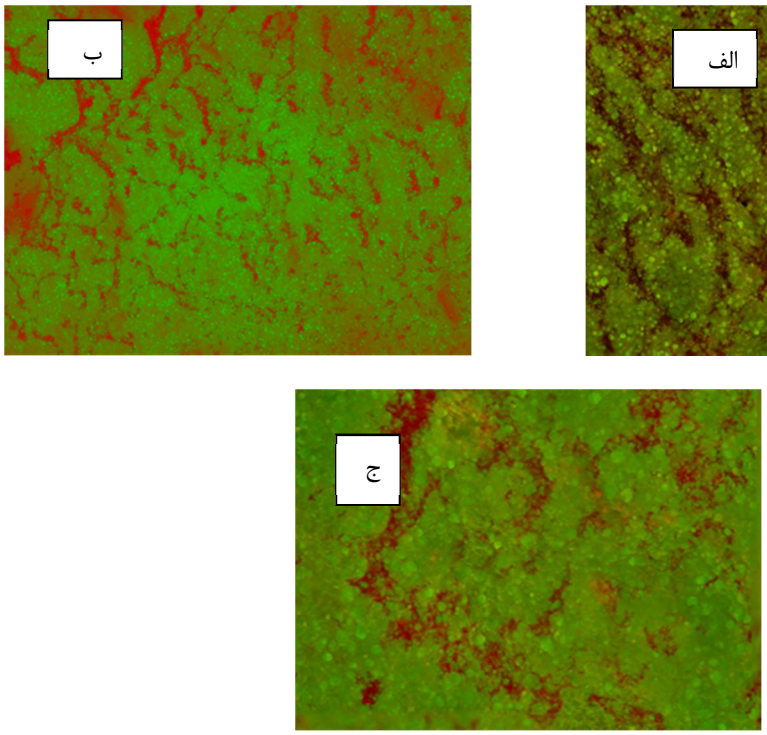
در دو بزرگ‌نمایی مختلف نشان داده شده است. ۱ ساعت بعد از رنگ‌آمیزی انتشار کامل فلورسئین و ردامین انجام شده و گرانول‌های نشاسته به رنگ سبز و مولکول‌های پروتئین به رنگ قرمز نمایان می‌گردند. همچنین فلورسنس نمونه‌ها به میزان مطلوبی افزایش می‌یابد رنگ قرمز موجود در شکل (۱) مربوط به پروتئین رنگ‌آمیزی‌شده با ردامین B و رنگ سبز مربوط به گرانول‌های نشاستهٔ رنگ‌آمیزی‌شده با FITC می‌باشد. شکل (۱-الف) و (۱-د)، ریزساختار نمونه‌های خمیر تهیه‌شده با خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس پارالیمنتاریوس* را با بزرگ‌نمایی کوچک و شکل (۱-ب) و (۱-ج)، ریزساختار آنها را با بزرگ‌نمایی بزرگ‌تری نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل (۱) ملاحظه می‌شود شبکهٔ گلوتنی به‌صورت پیوسته و لایه‌لایه است و آثاری از تخریب دیده نمی‌شود. شکل (۲- الف)، (۲-ب) و (۲-ج) تصاویر مربوط به ریزساختار نمونه‌های خمیر تهیه‌شده با خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس کورواتوس* را نشان می‌دهد که در آنها شبکهٔ گلوتنی به خوبی تشکیل شده است.



شکل ۱- تصاویر مربوط به ریزساختار نمونه‌های خمیر تهیه‌شده با خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس پارالیمنتاریوس*. الف) مقیاس ۵ میکرومتر، ب) مقیاس ۱۰ میکرومتر، ج) مقیاس ۱۰ میکرومتر، د) مقیاس ۵ میکرومتر

نتایج مشاهده‌های ریزساختاری نمونه‌های خمیر تهیه‌شده با پودر خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس کورواتوس*

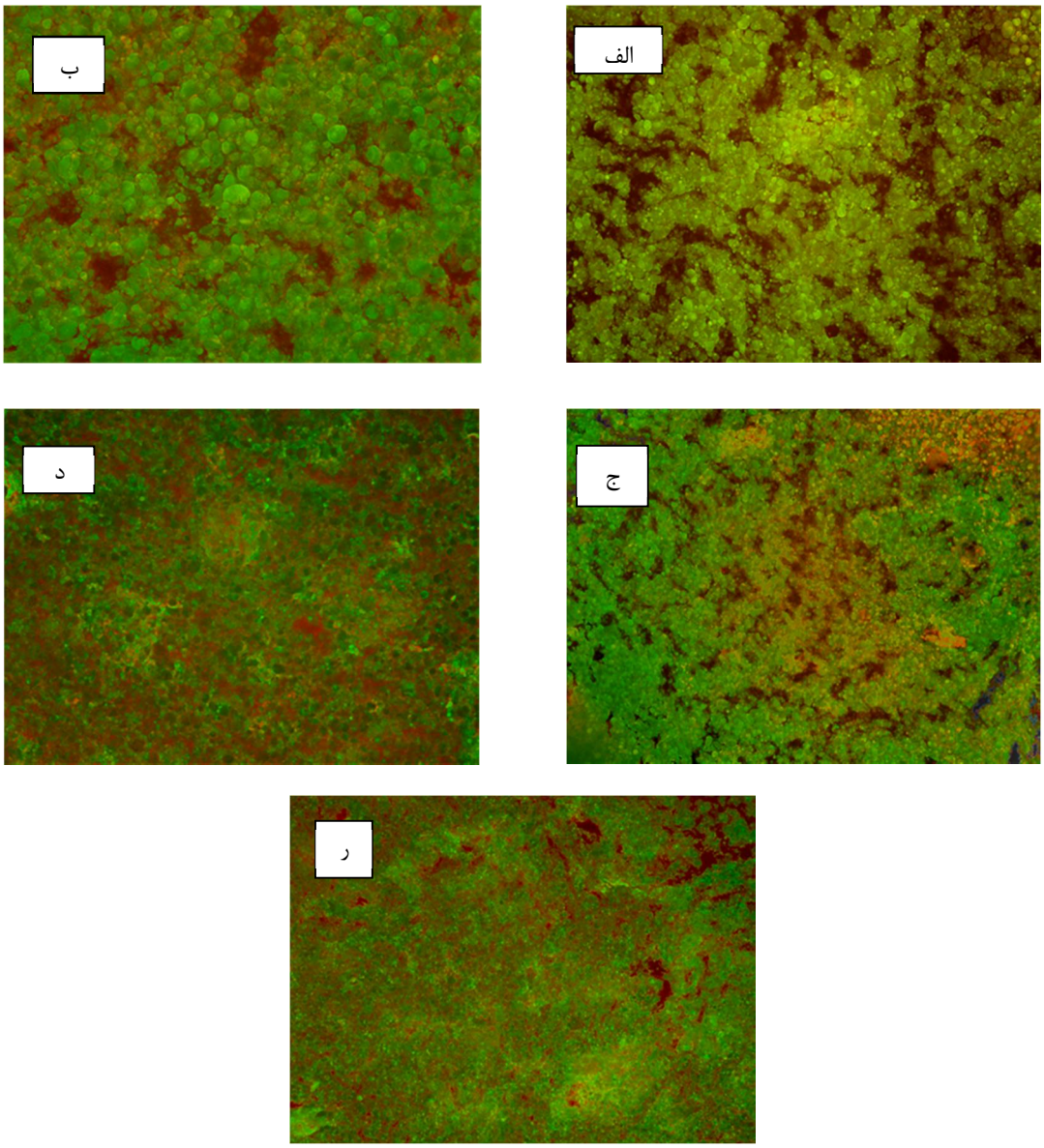
ریزساختار خمیر رنگ‌آمیزی‌شده با FITC ۱ درصد و ردامین B ۰/۱ درصد در شکل (۲-الف) و (۲-ب)، با بزرگ‌نمایی کوچک و شکل (۲-ج)، با بزرگ‌نمایی بزرگ‌تری نشان داده شده است. براساس گزارش‌های موجود در منابع علمی انتظار می‌رود که شبکهٔ گلوتنی به‌صورت توده‌های پراکندهٔ گلوتنی به‌صورت فاز گلوتنی کاملاً گسسته و پراکنده‌شده درآید (Peighambardoust *et al.*, 2006). همان‌طور که ملاحظه می‌شود افزودن پودر خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس کوارتوس* تأثیری بر پیوستگی شبکهٔ پروتئینی نداشته و شبکهٔ پروتئینی به‌صورت پیوسته به رنگ قرمز و به‌صورت لایه‌لایه دیده می‌شود. که می‌توان آن را به کافی‌نبودن مقدار میکروارگانیسم‌ها، کم‌بودن زمان استراحت بعد از تهیهٔ خمیر و یا کافی‌نبودن فعالیت میکروارگانیسم‌ها نسبت داد.



شکل ۲- تصاویرمربوط به ریزساختار نمونه‌های خمیر تهیه‌شده با خمیرترش حاوی لاکتوباسیلوس کورواتوس. الف) با مقیاس ۵ میکرومتر، ب) با مقیاس ۵ میکرومتر، ج) با مقیاس ۱۰ میکرومتر

نتایج مشاهده‌های ریزساختاری نمونه‌های خمیر تهیه‌شده با پودر خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

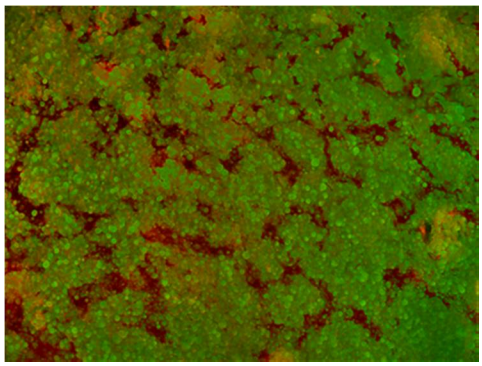
بررسی تصاویر میکروسکوپی حاصل از خمیر تهیه‌شده با پودر خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با میکروسکوپ اپی‌فلورسنس که با FITC ۱ درصد و ردامین B ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی شده بود، ۱ ساعت پس از پخش رنگ مشاهده گردید شبکهٔ گلوتنی پیوستگی خود را حفظ نموده است و برخلاف تصور که انتظار می‌رفت تجمع مولکول‌های پروتئین در قسمت‌های مختلف ایجاد گردد، یک شبکهٔ پیوسته مشاهده می‌شود که در شکل (۳) به رنگ قرمز مشخص شده است. شکل (۳-الف)، (۳-ب)، (۳-ج)، (۳-د) و (۳-ر) شبکهٔ گلوتنی تشکیل‌شده در این خمیرها و پراکندگی کاملاً یکنواخت مولکول‌های پروتئین در قسمت‌های مختلف را نشان می‌دهد. در تصاویر به‌دست‌آمده گرانول‌های نشاسته به رنگ سبز و پروتئین موجود در نمونه‌های خمیر به رنگ قرمز قابل مشاهده می‌باشند (Dominguez *et al*., 2003) فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک برخی از *لاکتوباسیلوس‌های* خمیرترش را اندازه‌گیری کرده و پروتئولیز گلوتن را مشاهده کردند که در تناقض با نتایج این مطالعه می‌باشد. این محققین نشان دادند که پپتیدهای مشتق‌شده از گلوتن طی تخمیرهای خمیرترش آزاد و وارد محیط شدند و آنها این پپتییدهای آزادشده را به فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبت دادند. شایان ذکر است که گلوتن (سوبسترا) مورد استفاده در آزمایش آنها از آرد گندم تهیه شده و احتمالاً حاوی برخی از پروتئازهای گندم بوده است.



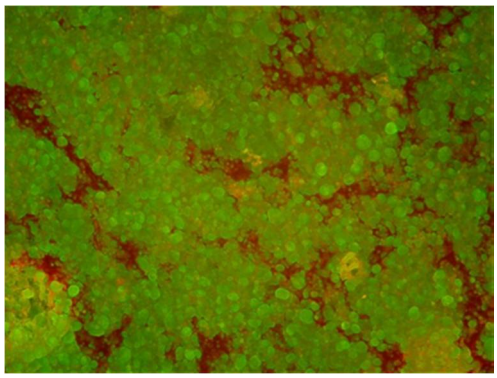
شکل ۳- تصاویرمربوط به ریزساختار نمونه‌های خمیر تهیه‌شده با خمیرترش حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*. الف) با مقیاس ۱۰ میکرومتر، ب) با مقیاس ۱۶ میکرومتر، ج) با مقیاس ۶/۲۵ میکرومتر، د) با مقیاس ۱۰ میکرومتر، ر) با مقیاس ۴ میکرومتر

خمیر تهیه‌شده بدون خمیرترش (شاهد)

بررسی ریزساختار خمیر شاهد نشان داد همان‌طور که انتظار می‌رفت به‌دلیل عدم حضور میکروارگانیسم‌های خمیرترش، شبکهٔ گلوتنی پیوسته و یکنواخت تشکیل شده و با رنگ قرمز در شکل (۴) با بزرگ‌نمایی کوچک و شکل (۵) با بزرگ‌نمایی بزرگ مشخص می‌باشد.



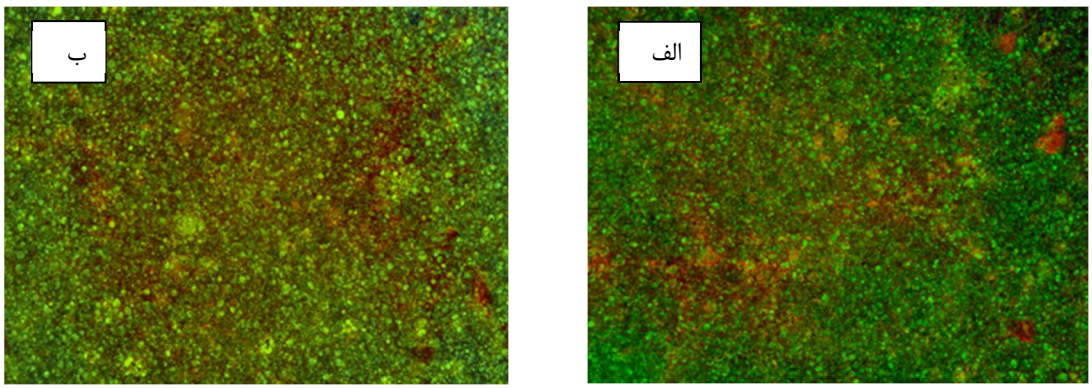
شکل ۴- تصویر مربوط به ریزساختار نمونه‌های خمیر تهیه‌شده بدون خمیرترش (شاهد) با مقیاس ۲/۵ میکرومتر



شکل ۵- تصویر مربوط به ریزساختار نمونه‌های خمیر تهیه‌شده بدون خمیرترش (شاهد) با مقیاس ۱۰ میکرومتر

نتایج مشاهده‌های ریزساختاری نمونه‌های خمیر تهیه‌شده با خمیرترش سنتی

شکل (۶) تصاویر مربوط به ریزساختار نمونه‌های خمیر تهیه‌شده با خمیرترش سنتی در دو بزرگ‌نمایی مختلف می‌باشد. رنگ قرمز موجود در شکل‌ها مربوط به پروتئین رنگ‌آمیزی‌شده با رودامین و رنگ سبز مربوط به گرانول‌های نشاستهٔ رنگ‌آمیزی‌شده با FITC می‌باشد. همان‌طور که در تصاویر ملاحظه می‌شود گلوتن موجود در خمیر به میزان کافی توسعه‌نیافته و پروتئین‌ها به‌صورت تجمع‌یافته در تصویر دیده می‌شوند که این مسئله بیانگر پخش غیریکنواخت و ناهمگن مولکول‌های پروتئین و عدم توسعهٔ آن در این نمونه‌هاست. ازاین‌رو، می‌توان گفت، در خمیر سنتی اثرات تخریبی میکروارگانیسم‌ها بیشتر بوده و تخریب شبکهٔ گلوتنی بیشتر است این نتایج با مشاهده‌های Peighambardoust و همکاران (۲۰۰۶) با روش میکروسکوپ روبندهٔ کونفوکال لیزری تطابق دارد.



شکل ۶- تصاویر مربوط به ریزساختار نمونه‌های خمیر تهیه‌شده با خمیرترش سنتی. الف) با مقیاس ۵ میکرومتر، ب) با مقیاس ۵ میکرومتر

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل بیانگر این مطلب است که میکروسکوپ اپی فلورسنس جایگزین بسیار مناسبی برای میکروسکوپ کونفوکال در بررسی نمونه‌های خمیر بوده و تصاویر آن با تصاویر برداشت‌شده توسط میکروسکوپ کونفوکال برابری می‌کند، درحالی‌که هزینه و زمان کمتری را در بررسی نمونه‌ها صرف می‌کند. ازسوی‌دیگر به‌علت تفکیک مناسب رنگ و میدان دید وسیع، تخریب فلورسنس نمونه‌ها بسیار پایین‌تر است. باتوجه‌به اینکه میکروسکوپ اپی‌فلورسنس در مقایسه با میکروسکوپ الکترونی روبنده، ازطریق گوناگونی رنگ، تفکیک ریزساختارها را به نحو مطلوب‌تری انجام می‌دهد می‌توان آن را بر میکروسکوپ الکترونی روبنده که تصاویر سیاه و سفید (مونوکروم) می‌دهد، ارجح دانست. به‌منظور بررسی ساختار شبکه‌های پروتئینی موجود در نمونه‌های خمیرترش، با استفاده از روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی، نتیجه‌گیری شد که رنگ‌آمیزی مزدوج یا توأم با استفاده از نسبت ۱:۱ FITC ۱ درصد تهیه‌شده در حلال DMSO و رودامین B. ۰/۱ درصد، بهترین تصاویر میکروسکوپی را ارائه می‌نماید. بررسی ریزساختاری نمونه‌های رنگ‌آمیزی‌شده نشان داد که شبکهٔ گلوتنی به‌صورت پیوسته و لایه‌لایه است و به‌خوبی تشکیل گردیده و آثاری از تخریب دیده نمی‌شود که می‌توان آن را به کافی‌نبودن مقدار میکروارگانیسم‌ها، کم‌بودن زمان استراحت بعد از تهیهٔ خمیر و یا کافی‌نبودن فعالیت میکروارگانیسم‌ها نسبت داد.

منابع

۱- امین‌پور، آ.، ۱۳۷۴. ارزش تغذیه‌ای نان و مناسب‌ترین الگوی مصرف آن در تأمین نیازمندی‌های مردم. مجموعه مقالات اجلاس تخصصی نان. انیستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، ۳۶۳: ۳۹-۲۸.

۲- پیغمبردوست، س.ه.، رئیسی کاهوری، ن. و عیوض‌زاده، ا. ۱۳۹۳. اثر خمیرترش خشک‌شده حاوی مخلوط گونه‌های *لاکتوباسیلوس* بر کیفیت آرد گندم و خواص. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۴(۴): ۶۱۴-۶۲۳.

۳- پیغمبردوست، س. ه. ۱۳۷۵. بررسی تأثیر درجهٔ استخراج آرد روی ترکیب آرد، خواص رئولوژیک خمیر و کیفیت نان‌های مسطح ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

4- Ananta, E., Volkert, M., & Knorr, D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried Lactobacillus rhamnosus GG. International Dairy Journal, 15(4): 399-409.

5- Augustin Clarke, P., Chandan, R.C., Kilara, A., & Shah, N.P. 2008. Dry Milk Products. Dairy Processing & Quality Assurance , 15(3): 265-270

6- Bache, I.C., & Donald, A.M. 1998. The structure of the gluten network in dough: a study using Environmental Scanning Electron Microscopy. Cereal Science, 28(2): 127-133.

7- Bahraei, S., Saidi, A., & Alizadeh, D. 2004. High molecular weight glutenin subunits of current current bread wheats grown in Iran. Euphytica, 137(2): 173-9.

8- Dominguez, G., Neyra-Guevara, M., Farrera-Rebollo, R., Arana-Errasquin, R., & Mora-Escobedo, R. 2003. Structural and farinographic change during mixing of a yeast sweet dough. Nahrung-Food. Molecular Nutrition & Food Research, 47(5): 312-319.

9- Golshan Tafti, A., Peighambardoust, S.H., Hesari, J., Bahrami, A., & Shakuoie Bonab, A. 2013. Physico-chemical and functional properties of spray-dried sourdough in breadmaking. Food Science and Technology International, 19(3):271-278.

10- Hansen, A., & Hansen, B. 1994. Volatile compounds in wheat sourdoughs produuced by lactic acid bacteria and sourdough yeasts. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 198(3):202-209.

11- Herman, B. 1998. Fluorescence Microscopy. BIOS Scientific Publisher. Second Edition. 200-230.

12- IDF, D. 1993. Dried Milk and Dried Cream. Determination of Water Content. International Dairy Federation Standard 26A.

13- Kam, P.V., Bianchin, A., & Bullerman, L.B. 2006. Inhibition of mold growth by sourdough bread cultures. Review of Undergraduate Research in Agricultural and Life Sciences, 2(1): 1-11.

14- Kuktaite, P. 2004. Protein Quality in Wheat: Change in Protein Polymer Composition during Grain Development and Dough Processing. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Alnarp.

15- Meuser, F., Barber, B., & Fischer, G. 1995. Determination of the microbial activity of dried sourdoughs by revitalization of their lactic acid bacteria and yeasts. Food Control, 6(3):147-154.

16- Peighambardoust, S.H., Van der Goot A.J., Van Vliet, T., Hamer, R.J., & Boom, R.M. 2006. Microstructure formation and rheological behaviour of dough under simple shear flow Journal of Cereal Science, 43(2): 183-97.

17- Peighambardoust, S.H., Van Der Goot, A.J., Hamer, R.J., & Boom, R.M. 2005. Effect of simple shear on the physical properties of Glutenin Macro Polymer (GMP). Journal of Cereal Science, 42(1): 59-68.

18- Piazza, L., & Masi, P. 1995. Moisture redistribution throughout the bread loaf during staling and its effect on mechanical properties. Cereal Chemistry, 72(3): 320-325.

19- Robert, H., Gabriel, V., Lefebvre, D., Rabier, P., Vayssier, Y., & Fontagné-Faucher, C. 2006. Study ofthe behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. LWT-Food Science and Technology, 39(3): 256-265.

20- Shinohara, M.Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T., & Nakahara, T. 2008. Survival of freeze-dried bacteria. Journal of General and Applied Microbiology, 54(1):9-24.

21- Wilson, A.J., Wooding, A.R., & Morgenstern, M.P. 1997. Comparison of work input requirement on laboratory-scale and industrial-scale mechanical dough development mixers. Cereal Chemistry, 74(6): 715.

The Effect of Spray Dried Sourdough Process on Gluten Development by Studying Dough Microstructure

Ayla Ayramloo[1], Parisa Jafarian[2*], Seyed Hadi Peighambardoust[3]

1- MSc Student, Pardis International Campus, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2- Ph.D. Student of Food Science, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
* Corresponding author (parisajafarian@yahoo.com)
3- Associate Professor, Department of Food Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

Sourdough is a complex biological system, consisting of such components as cereal carbohydrates and proteins, lactic acid bacteria and yeasts and different enzymes from which each of these taste, flavor and shelf life of bread can be improved with optimal use of sourdough. The aim of this study was to determine the effect of spray dried sourdough addition on gluten development through studying dough microstructure using epi-flurescence microscope. Therefore, the traditional dough was prepared by adding 15% sourdough powders containing three lactobacillus strains, which were previously isolated from Iranian traditional sourdoughs (Lactobacillus plantarum, Lactobacillus curvatus and Lactobacillus Paralimentarius), to the dough. According to microscopic observation with simultaneous staining of dough samples with rhodamine 1% and FITC 0.1%, it was showed that samples had continuous gluten network layer and protein network was not destroyed. Which can be attributed to the insufficient amount of microorganisms, low resting after preparing the dough and insufficient activity of microorganisms.

Keywords: Dough, Dried Sourdough, Gluten, Microstructure