

بهینه کردن روش آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی خمیر نان برای مشاهدات میکروسکوپ نوری اپی‌فلورسنس

معصومه دوکوهکی¹، سیدهدادی پیغمبر دوست^{2*}، محمدرضا دادپور³

1- دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

2- عضو هیأت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

3- عضو هیأت علمی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

مطالعه ریز ساختار خمیر ایزاری مفید و مؤثر برای درک اثر فرآیندهای مختلف روی خصوصیات خمیر و محصول نهایی آن می باشد. در این مطالعه پروتکل نحوه آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی نمونه های خمیر برای مشاهده ریز ساختار آن‌ها با میکروسکوپ نوری اپی فلورسنس (EFLM) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور عواملی مانند نوع رنگ، نوع حلال، غلظت رنگ، مدت زمان لازم برای انتشار رنگ در نمونه و نوع فیلتر مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان دادند که رنگ‌آمیزی نمونه‌های خمیر با مخلوط فلورسنتین سدیم 1 درصد و رودامین B 0/1 درصد (وزنی - حجمی) در حلال 2- متواکسی اتانول، بهترین نتایج را ارائه می کند. در این شیوه رنگ‌آمیزی، گرانول‌های نشاسته با رنگدانه فلورسنتین و فاز پروتئینی با رنگدانه رودامین B با وضوح بالا از همدیگر تفکیک گشته و شیوه رنگ‌آمیزی به کار رفته امکان مشاهده هر دو جزء نشاسته و گلوتن را به صورت همزمان فراهم می سازد. زمان استراحت نمونه‌های خمیر بعد از رنگ آمیزی و قبل از مشاهده میکروسکوپی نیز روی کیفیت تصاویر تأثیر گذار بود، به طوریکه زمان حداقل 60 دقیقه، بهترین نتایج را ارائه داد. در رابطه با فیلترهای گوناگون مورد استفاده برای میکروسکوپ اپی فلورسنس، فیلتر MWBV2 مربوط به طیف نوری 420 نانومتر، از دیگر فیلترها مناسب تر تشخیص داده شد. با بهره گیری از روش‌های اختصاصی پردازش تصاویر دیجیتال و تصحیح عمق میدان در تصاویر اولیه بدست آمده، کیفیت تصاویر میکروسکوپی بهبود یافت. در نهایت با شکل گیری پروتکل و روش مناسب برای مشاهدات EFLM، ریز ساختار خمیر و تغییرات به عمل آمده روی شبکه گلوتهی آن در سه زمان مخلوط کردن کوتاه، مطلوب و بیش از حد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج کلی روی خمیرهای مخلوط شده در زمان‌های مختلف نشان دادند که تکنیک EFLM تصاویری با کیفیت مطلوب و قابل مقایسه با روش میکروسکوپ لیزری کونفوکال ارائه می نماید.

کلید واژگان: آرد، خمیر، ریز ساختار، رنگ‌آمیزی، میکروسکوپ نوری اپی فلورسنس (EFLM)

1- مقدمه

اجزای خمیر، هیدراسیون ذرات آرد، اعمال انرژی مکانیکی و وارد کردن حباب‌های هوا به خمیر (هوادهی) مستتر می‌باشند. در این خمیر شبکه گلوتهی ویسکوالاستیک با قابلیت نگهداری گاز تشکیل

خمیر نان با ترکیب و مخلوط کردن آب و آرد و با اعمال انرژی یا کار مکانیکی طی مرحله مخلوط کردن تهیه می شود که این مرحله نقش مهمی در کیفیت نان دارد. در مخلوط کردن خمیر عملیات توزیع و پراکنده کردن

*مسئول مکاتبات: peighambardoust@tabrizu.ac.ir

میکروسکوپ های CSLM دارای مزایای متعددی هستند. به طور مثال مطالعه ریزساختار نمونه ها بدون آسیب به بافت آنها امکان پذیر بوده و این میکروسکوپ ها قادر به اسکن کردن و تصویر برداری از نمونه های با ضخامت 10-30 میکرومتری باشند [8، 16]. همچنین در این میکروسکوپ ها امکان رنگ آمیزی همزمان ترکیبات مختلف نمونه وجود دارد که با ایجاد رنگ های متمایز، تفکیک آنها را به سادگی امکان پذیر می سازد. اما محدودیت هایی نیز در استفاده از این میکروسکوپ ها وجود دارد. به عنوان مثال امکان حباب دار شدن نمونه ها تحت نور لیزر وجود دارد که زدودن آنها در حین مطالعه امری دشوار است. در این میکروسکوپ به علت تمرکز نقطه ای نور لیزر، فلورسنس زدایی نمونه و سفید شدن آن امری اجتناب ناپذیر است. هم چنین زمان روبش⁵ بالا در میکروسکوپ های کونفوکال منجر به عدم برداشت میدان دید وسیع می گردد [12، 13]. با توجه به مطالب ذکر شده، و از همه مهمتر هزینه های بالا و پیچیدگی های دستگاهی روشهای فوق، استفاده از آنها را در بررسی ریزساختار خمیر، محدود می نماید.

در روش جایگزین که برای اولین بار در این مطالعه ارائه گردیده است از میکروسکوپ نوری اپی فلورسنس⁶ (EFLM) برای مطالعه ریز ساختار خمیر استفاده گردیده است. هزینه اولیه (قیمت تمام شده) این میکروسکوپ بسیار پائین تر از انواع فوق الذکر بوده و مزایای چندی نیز به همراه دارد. در میکروسکوپ اپی فلورسنس علاوه بر امکان پذیر بودن میدان دید وسیع، مشکل سفید شدن ناشی از فلورسنس زدایی وجود ندارد. همچنین در این میکروسکوپ به دلیل عدم انجام اسکنینگ، زمان تصویربرداری کوتاه و نورپردازی یکنواخت می گردد. به علت متفاوت بودن طیف های نشر و برانگیخته شدن مولکولهای مختلف، این میکروسکوپ به صورت اختصاصی عمل کرده و دارای حساسیت زیادی می باشد بطوریکه آشکار سازی، فقط با تعداد کمی از مولکولهای فلورسنت قابل انجام است [12].

در این مطالعه تغییرات به عمل آمده روی ریزساختار خمیرهای مخلوط شده در زمانهای مخلوط کردن کوتاه⁷، بهینه⁸ و بیش از حد⁹ با استفاده از میکروسکوپ نوری اپی فلورسنس مورد مطالعه قرار گرفت. به کمک این روش، رنگ آمیزی نشاسته و پروتئین به صورت غیر کووالانت انجام شده و قابلیت تفکیک آنها به سادگی

می گردد [1، 2] که تشکیل چنین شبکه ای کیفیت نان را تعیین می کند، بنابراین بررسی ریز ساختار خمیر برای مطالعه اثرات فرآیند ابزاری مفید خواهد بود.

بیشتر مطالعات بر روی ساختار شبکه گلو تن در خمیر آرد گندم با استفاده از میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ الکترونی روبنده¹ (SEM)، میکروسکوپ الکترونی روبنده محیطی² (ESEM) و میکروسکوپ روبنده کونفوکال لیزری³ (CSLM) انجام گرفته است [3-6، 7-11]. بررسی منابع موجود نشان می دهد که مراحل آماده سازی نمونه در میکروسکوپ SEM دشوار بوده و به مراحل متعدد و زمان بر پاشش طلا ولایه گذاری نیازمند است و ارائه تصاویر سیاه و سفید (مونوکروم)، تفکیک گرانول های نشاسته و پروتئین از یکدیگر را فقط از طریق اندازه آنها امکان پذیر می سازد [12، 13]. علاوه بر آن در اثر خلاء بالای موجود در این میکروسکوپ، نمونه های مرطوب مانند گلو تن دچار آبگیری شدید شده و تصویر برداری از آنها بدون تیمار قبلی امکان پذیر نمی باشد. راه حل معمول برای رفع این مشکل خشک کردن نمونه قبل از تصویر برداری است که با استفاده از خشک کردن انجمادی انجام می پذیرد تا حداقل آسیب به بافت نمونه برسد. برای اصلاح این وضعیت از میکروسکوپ ESEM استفاده می شود که به جای خلاء بالا در محیط اطراف نمونه، به فشار گاز نیاز دارند [3].

میکروسکوپ ESEM یک میکروسکوپ با فشار متغیر است که مشاهده نمونه های بدون پوشش، مرطوب، خشک و روغنی را در محدوده ای از خلاء به میزان 1 الی 20 تور⁴ امکان پذیر می سازد [14]. اما این نوع میکروسکوپ ها علاوه بر استفاده از پمپ های ویژه برای تنظیم فشار به دکتورهای پیشرفته مانند دکتور الکترونی محیطی یا گازی نیاز دارند [3] که کاربرد آنها را به دلیل پیچیدگی های موجود و هزینه های گزاف محدود می سازد. علاوه بر موارد ذکر شده میکروسکوپ های ESEM و SEM علی رغم قابلیت تفکیک بالا به دلیل حضور محیط گازی داخل محفظه نمونه دارای تصویری فاقد فوکوس واضح و روشن می باشند [15]. در این نوع میکروسکوپ ها احتمال حضور خطاهای تصویری وجود دارد که در حین آماده سازی نمونه به وجود آمده و تشخیص این که یک عکس ویژه یک عکس صحیح از هدف می باشد را با مشکل همراه می سازند [11].

5. Scanning
6. Epi Fluorescence Light Microscope (EFLM)
7. Under mixed
8. Optimally mixed
9. Over mixed

1. Scanning Electron Microscope
2. Environmental Scanning Electron Microscope
3. Confocal Scanning Laser Microscope
4. Torr

و زمان استراحت آنها قبل از مشاهدات میکروسکوپی معرفی خواهد گردید.

2- مواد و روش‌ها

2-1- آرد مورد استفاده

در این مطالعه از آرد نول با مشخصات مندرج در جدول 1 برای تهیه خمیر استفاده شد.

جدول 1 ویژگی های آرد مورد آزمون

رطوبت (درصد)	خاکستر (درصد)	درجه استخراج (درصد)	پروتئین (درصد)	گلوتن مرطوب (درصد)	عدد زلنی سانتیمرکعب	درصد جذب آب (درصد)
13/5	0/56	75-72	11/9	23	26	60

کشسانی مطلوب می کرد، اندازه گیری شد و به تبع آن زمان‌های خیلی کمتر (2 دقیقه) و خیلی بیشتر (40 دقیقه) از آن حد انتخاب گردیدند. خمیرهای مخلوط شده بلافاصله در ازت مایع منجمد گردیده و تا انجام آزمون‌های میکروسکوپی در فریزر با دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

2-4- آماده‌سازی نمونه‌های خمیر برای مشاهدات میکروسکوپی

خمیرهای منجمد در حالت انجماد و در داخل فریزر صندوقی (دمای تقریبی 10- درجه سانتی‌گراد) با استفاده از مایکروتوم دستی برش داده شده طوریکه لایه های نازک خمیر با ضخامت 3 تا 5 میلی‌متر بدست آمده بلافاصله روی اسلاید شیشه ای قرار گرفته و برای رنگ آمیزی مورد استفاده قرار گرفتند.

2-5- آزمون تعیین حلال

محلول 1٪ از رنگ‌های فلوراسین، فلورسئین سدیم، فلورسئین، آنیلین بلو، رودامین B، متیل رد، فست گرین، یدین گرین، اسید فوشین، آزر بلو درحلال‌هایی نظیر اتانول، آب مقطر، استون، دی-متیل فرمامید و 2- متواکسی اتانول تهیه و قابلیت حل شدن هر یک از رنگ‌ها در حلال‌های مذکور بررسی شد. قابلیت حل شدن از روی زمانی بدست می آید که رنگ مورد نظر در حلال انتخاب شده به راحتی و بدون نیاز به حرارت و زمان طولانی مخلوط کردن حل گردد.

2-6- آزمون تعیین رنگ

در این مطالعه طیف وسیعی از رنگ‌های احتمالی (فلوراسین، فلورسئین سدیم، فلورسئین، آنیلین بلو، رودامین B، متیل رد، فست

امکان پذیر می گردد. مطالعه ریز ساختار خمیر براساس مشاهده همزمان شبکه گلوتنی و فاز نشاسته از طریق رنگ آمیزی مزدوج طراحی گردیده است و در این مقاله شرایط آماده سازی و رنگ آمیزی با در نظر گرفتن عوامل مختلفی مانند نوع رنگ، نوع حلال، غلظت رنگ، مدت زمان لازم برای انتشار رنگ در نمونه و نوع فیلتر مورد بررسی قرار گرفته و بهترین شرایط رنگ آمیزی نمونه ها

2-2- رنگها و حلال های مورد استفاده برای رنگ آمیزی نمونه ها

رنگ‌های فلوراسین¹، فلورسئین سدیم²، فلورسئین³، آنیلین بلو⁴، رودامین B⁵، متیل رد⁶، فست گرین⁷، یدین گرین⁸، اسید فوشین⁹، آزر بلو¹⁰ و حلال‌هایی چون اتانول، استون، دی‌متیل فرمامید¹¹ و 2- متواکسی اتانول¹² از شرکت مرک آلمان با خلوص تجزیه ای تهیه گردیدند.

2-3- روش تهیه نمونه‌های خمیر

برای تهیه خمیر از مخلوط‌کن آزمایشگاهی اسپیرال 2 کیلوگرمی Clatronic مدل KM3067 استفاده شد. در فرمول خمیر از 2 درصد (وزنی) نمک طعام بدون افزودن مخمر استفاده شد. مقدار آب (شهری) افزوده شده با توجه به تشکیل خمیر با قوام مناسب (از روی ارزیابی حسی و تجربی) در حدود 63٪ وزن آرد (وزن مرطوب) اضافه گردید. زمان اختلاط خمیر برای سه نمونه خمیر مورد آزمون به ترتیب 2، 15 و 40 دقیقه در نظر گرفته شد تا تصویری از شرایط مخلوط کردن کوتاه، بهینه و بیش از حد را ارائه نماید. زمان بهینه مخلوط کردن (15 دقیقه) با توجه به ارزیابی حسی و تجربی خمیر که تولید خمیر ویسکوالاستیک با خواص

1. Fluorasin
2. Sodium Fluorescein
3. Fluorescein
4. Anilin Blue
5. Rhodamine B
6. Methyl Red
7. Fast Green
8. Iodine Green
9. Acid Fushin
10. Azer Blue
11. Dimethylformamid
12. 2-Methoxyethanol

برای مشاهده ریز ساختار با میکروسکوپ نوری اپی فلورسنس از قبیل فیلترهای کد MWG2، MWIY2 و MWBV2 به ترتیب در طیف های نوری 560، 510 و 420 نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند تا مناسب ترین فیلتر انتخاب گردد.

گرین، یدین گرین، اسید فوشین و آزر بلو) که در منابع مختلف از آن‌ها برای رنگ آمیزی پروتئین و نشاسته استفاده شده بود انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. مخلوط رنگی با نسبت 1:1 از محلول-های رنگی مذکور برای رنگ آمیزی نمونه‌های خمیر استفاده شد.

2-7- آزمون تعیین غلظت محلول‌های رنگی

با توجه به نتایج آزمون تعیین رنگ و نیز انتخاب حلال مناسب برای آن‌ها که بهترین قدرت انحلال و یکنواختی را ارائه دهد بهترین مواد رنگ‌کننده برای رنگ آمیزی نشاسته و پروتئین نیز مد نظر قرار گرفتند. برای این منظور دو ماده رنگ‌کننده فلورسئین سدیم و رودامین B به ترتیب برای رنگ آمیزی نشاسته و پروتئین برگزیده شدند. در این قسمت لازم بود تا غلظت مورد استفاده این مواد رنگی معلوم گردد. با توجه به تحقیقات انجام گرفته در منابع علمی، رنگ‌های فلورسئین سدیم با دو غلظت 1 و 0/5 درصد و رودامین B با دو غلظت 0/1 و 0/3 درصد (وزنی - حجمی) مورد بررسی قرار گرفتند. برای انتخاب بهترین غلظت در ترکیب دو ماده رنگ‌کننده، تیمارهای زیر برای رنگ آمیزی خمیر مخلوط شده در زمان بهینه مورد بررسی قرار گرفته و مشاهدات میکروسکوپی انجام شد:

الف) رودامین B 0/3 درصد، فلورسئین سدیم 0/5 درصد

ب) رودامین B 0/1 درصد، فلورسئین سدیم 0/5 درصد

ج) رودامین B 0/3 درصد، فلورسئین سدیم 1 درصد

د) رودامین B 0/1 درصد، فلورسئین سدیم 1 درصد

2-8- آزمون تعیین مدت زمان لازم قبل از

مشاهده میکروسکوپی

با توجه به نتایج به دست آمده از بخش‌های قبل و مشخص شدن نوع حلال، رنگ و غلظت‌های ترکیبی لازم بود تا مدت استراحت خمیرها بعد از رنگ آمیزی نیز معلوم گردد. برای این منظور به نمونه‌های خمیر با زمان مخلوط کردن بهینه، بعد از رنگ آمیزی با مخلوط رنگی مورد نظر به مدت 0/5، 1، 2 و 3 ساعت استراحت داده شد. به منظور جلوگیری از خشک شدن نمونه‌ها لام‌های نمونه داخل پلیت‌های شیشه‌ای قرار داده شدند و منافذ پلیت توسط نوار پلاستیکی استرچ (پارافیلیم) به طور کامل پوشانده و مشاهدات میکروسکوپی انجام شد.

2-9- آزمون تعیین نوع فیلتر

با مشخص شدن مناسب ترین حلال و رنگ در بهترین غلظت و بهترین زمان استراحت، در مرحله بعد فیلترهای مختلف قابل کاربرد

2-10- بررسی ریز ساختار نمونه‌های خمیر با

مدت زمان مخلوط کردن کوتاه، بهینه و بیش از حد

بعد از مشخص شدن همه فاکتورهای مورد نیاز برای رنگ آمیزی مطلوب که در بندهای 2-5 تا 2-9 مورد بررسی قرار گرفتند، نمونه‌های خمیر در شرایط منجمد توسط دستگاه میکروتوم¹ دستی به قطعات مکعب مستطیل به ابعاد تقریبی 2x2x3 سانتیمتر برش داده شد تا سطحی صاف و صیقلی برای نمونه‌های خمیر حاصل گردد. سپس یک قطره (در حدود یک سانتیمتر مکعب) از مخلوط دو ماده رنگی انتخاب شده در محل مناسب روی نمونه خمیر قرار داده شده و استراحت خمیر به مدت زمان مطلوب در شرایطی که نمونه خشک نشود انجام گردید. سپس مشاهدات میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ اپی فلورسنس مدل بی ایکس 51² ساخت شرکت الیمپوس آمریکا مجهز به نور مرکوری انجام شد. تصویربرداری با دوربین پیشرفته خنک شونده³ هاماماتسو⁴ با قدرت تفکیک رنگ 14 بیت به ازاء هر کانال (RGB) صورت گرفت.

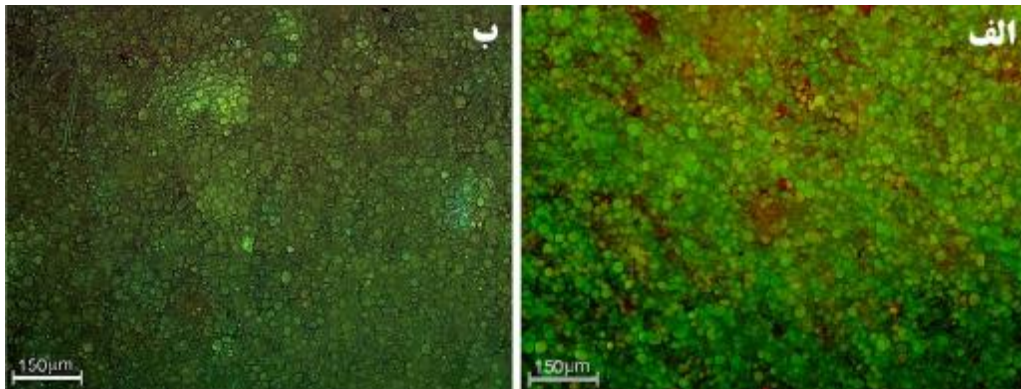
3- نتایج و بحث

3-1- آزمون تعیین حلال

نتایج حاصل از بررسی حلال‌های اتانول، آب مقطر، استون، دی متیل فرمامید و 2- متواکسی اتانول نشان داد که بیشتر رنگ‌های مورد آزمون در این مطالعه حلالیت ضعیفی در دی متیل فرمامید دارند و برخی از رنگ‌ها برای حل شدن در تعدادی از حلال‌ها به زمان طولانی و یا حرارت نیاز دارند در حالی که اکثر آن‌ها در حلال 2- متواکسی اتانول به خوبی حل می‌شوند. بنابراین در رنگ آمیزی نمونه‌ها، از محلول رنگ‌های ذکر شده در حلال 2- متواکسی اتانول استفاده شد.

1. Microtome
2. Olympus BX51
3. Cooled CCD
4. Hamamatsu

گرفته بودند، نسبت به سایر رنگ‌ها هم‌پوشانی کمتری نشان داده و به علت ایجاد رنگ‌های کاملاً متمایز سبز (نشاسته) و قرمز (پروتئین) قابلیت تفکیک خوبی ارائه می‌دهند. در حالی که استفاده از سایر رنگ‌ها برای رنگ‌آمیزی همزمان نشاسته و پروتئین تمایز مناسبی را ایجاد نکرد.



شکل 1 تصاویر مربوط به رنگ آمیزی نمونه با رنگهای مزدوج مختلف: الف) فلورسئین سدیم و رودامین، ب) آنیلین بلو و اسید فوشین

شکل 1- الف نمونه خمیر رنگ آمیزی شده با فلورسئین سدیم و رودامین B و شکل 1- ب نمونه خمیر رنگ آمیزی شده با مخلوطی از رنگهای آنیلین بلو (برای رنگ‌آمیزی نشاسته) و اسید فوشین (برای رنگ‌آمیزی پروتئین) را نشان می‌دهد. همانطور که از مقایسه این دو تصویر مشخص می‌گردد استفاده هم‌زمان از فلورسئین سدیم و رودامین B منجر به ارائه تصاویر بهتر از ریزساختار خمیر با مشاهده گرانول‌های نشاسته (سبز) و شبکه گلوآنی (قرمز) می‌گردد. در نتیجه مخلوط رنگ‌های آنیلین بلو و اسید فوشین برای رنگ آمیزی توأم نشاسته و پروتئین مناسب نیستند.

شکل 1- الف نمونه خمیر رنگ آمیزی شده با فلورسئین سدیم و رودامین B و شکل 1- ب نمونه خمیر رنگ آمیزی شده با مخلوطی از رنگهای آنیلین بلو (برای رنگ‌آمیزی نشاسته) و اسید فوشین (برای رنگ‌آمیزی پروتئین) را نشان می‌دهد. همانطور که از مقایسه این دو تصویر مشخص می‌گردد استفاده هم‌زمان از فلورسئین سدیم و رودامین B منجر به ارائه تصاویر بهتر از ریزساختار خمیر با مشاهده گرانول‌های نشاسته (سبز) و شبکه گلوآنی (قرمز) می‌گردد. در نتیجه مخلوط رنگ‌های آنیلین بلو و اسید فوشین برای رنگ آمیزی توأم نشاسته و پروتئین مناسب نیستند.

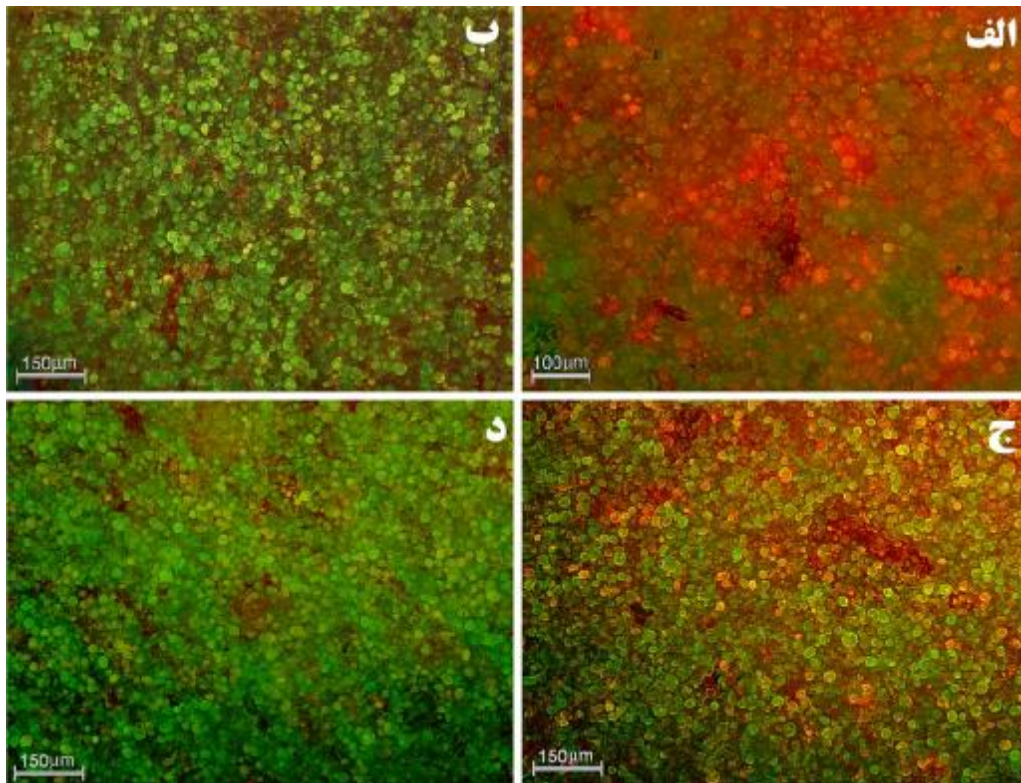
3-4- آزمون تعیین مدت زمان لازم قبل از

مشاهده میکروسکوپی

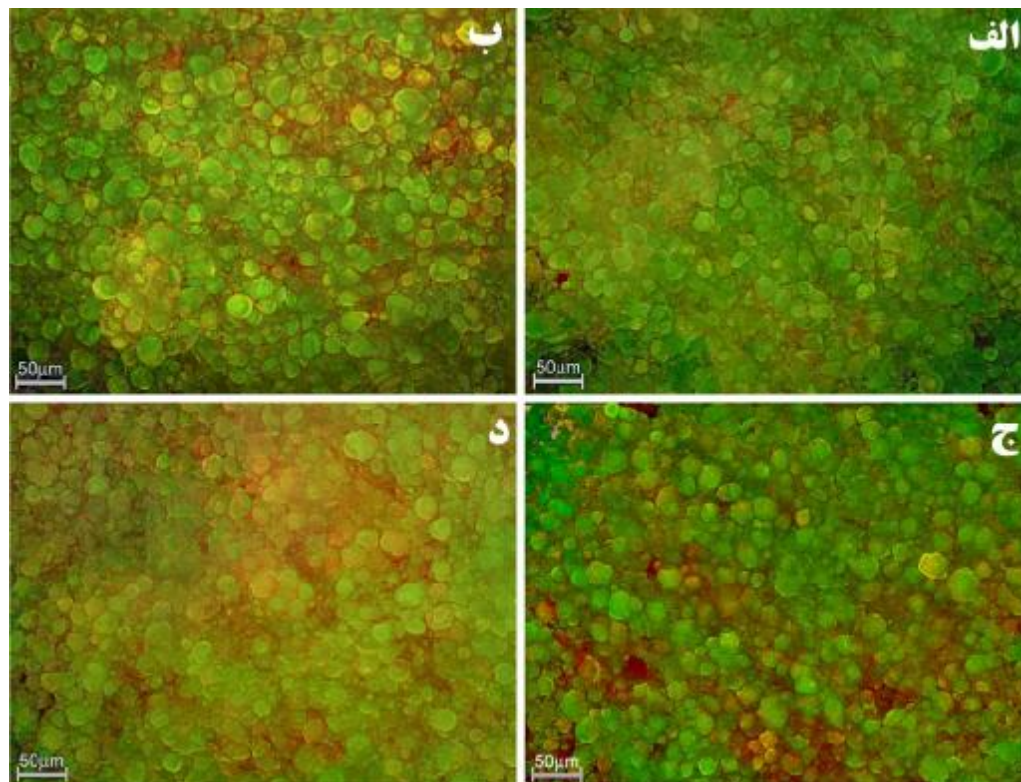
بعد از مشخص شدن نوع رنگ و حلال و نیز انتخاب مناسب ترکیب غلظت رنگ‌های مزدوج، زمان‌های 0/5، 1، 2، 3 ساعت قبل از مشاهدات میکروسکوپی برای پخش رنگ در نمونه‌ها در نظر گرفته شد. شکل (3- الف) نشان می‌دهد که با در نظر گرفتن مدت زمان 0/5 ساعت قبل از مشاهدات میکروسکوپی، پخش رنگ در نمونه به مقدار کافی نبوده به طوری که فرصت لازم برای انتشار رودامین به وجود نمی‌آید. با افزایش زمان به مدت یک ساعت (شکل 3- ب) انتشار کامل فلورسئین و رودامین انجام شده و گرانول‌های نشاسته به رنگ سبز و مولکول‌های پروتئین به رنگ

3-3- آزمون تعیین غلظت رنگ

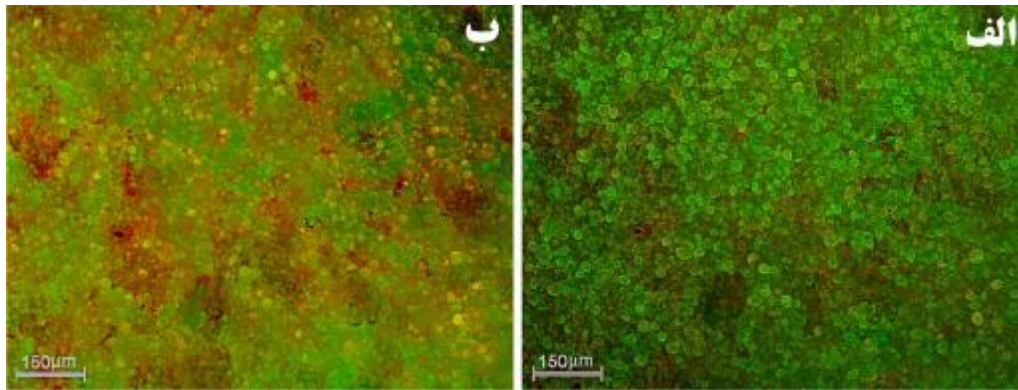
نتایج حاصل از ارزیابی غلظت‌های رنگ مورد استفاده در شکل 2 نشان داده شده است. شکل 2- الف مربوط به رودامین 0/3 درصد و فلورسئین سدیم 0/5 درصد، شکل 2- ب ریزساختار خمیر رنگ‌شده با رودامین 0/1 درصد و فلورسئین سدیم 0/5 درصد، شکل 2- ج مربوط به رودامین 0/3 درصد و فلورسئین سدیم 1 درصد و شکل 2- د تصویر مربوط به رودامین 0/1 درصد و فلورسئین سدیم 1 درصد می‌باشد. با مقایسه تصاویر الف، ب، ج و د در شکل 2 مشاهده می‌شود که استفاده از غلظت‌های بالای رودامین B (0/3%) منجر به ایجاد رنگ قرمز شدید شده و غلظت بالای آن در مقایسه با



شکل 2 تصاویر مربوط به رنگ آمیزی نمونه با درصد های مختلف مواد رنگی مورد استفاده به ترتیب ذیل: الف) رودامین B 0/3 درصد و فلورسئین سدیم 0/5 درصد، ب) رودامین B 0/1 درصد و فلورسئین سدیم 0/5 درصد، ج) رودامین B 0/3 درصد و فلورسئین سدیم 1 درصد، د) رودامین B 0/1 درصد و فلورسئین سدیم 1 درصد.



شکل 3 تصاویر مربوط به رنگ آمیزی نمونه های خمیر با رودامین B 0/1 درصد و فلورسئین سدیم 1 درصد در زمان (ساعت) های مختلف: الف) 0/5، ب) 1، ج) 2، د) 3 ساعت.



شکل 4. تصاویر میکروسکوپی حاصل از کاربرد فیلترهای مختلف: الف) فیلتر MWBV2 مربوط به طیف نوری 420 نانومتر، ب) فیلتر MWG2 مربوط به طیف نوری 510 نانومتر.

مشکل فیلتر مربوط به طیف های نوری 560 نانومتر از شدت بیشتری برخوردار بود (تصویر نشان داده نشده است).

3-6- مطالعه ریز ساختار خمیر: اثر زمان (انرژی)

مخلوط کردن

با مشخص شدن پروتکل مناسب برای انتخاب نوع رنگ و حلال، غلظت های ترکیبی مناسب برای رنگ های انتخاب شده، زمان های استراحت لازم برای توزیع رنگ و نیز انتخاب فیلتر مناسب برای مشاهده بهینه ریز ساختار خمیر، در مرحله بعد اثر فرایند مخلوط کردن در سه زمان کاملاً متفاوت (2، 15 و 40 دقیقه) روی ریزساختار خمیر مورد بررسی قرار گرفت تا پروتکل رنگ آمیزی بهینه شده مورد ارزیابی قرار گیرد. بر اساس گزارش های موجود در منابع علمی [19-4.9.17] انتظار می رود که شبکه گلوآنتی در خمیرهای کم مخلوط شده به صورت توده های پراکنده گلوآنتی و در خمیر های بهینه مخلوط شده به صورت شبکه ای یکپارچه و در خمیر های بیش از حد مخلوط شده به صورت فاز گلوآنتی کاملاً گسسته و پراکنده شده در آید. شکل 5 (الف، ب و ج) نتایج ریزساختاری حاصله از مطالعات میکروسکوپی فلورسانس با پروتکل توضیح داده شده در این مطالعه را نشان می دهد. تصویر 5-الف مربوط به خمیرهای مخلوط شده در زمان کم، تصویر 5-ب مربوط به خمیر مخلوط شده در زمان بهینه و تصویر 5-ج مربوط به زمان مخلوط کردن بیش از حد می باشد. رنگ قرمز موجود در شکل ها مربوط به مولکول های پروتئینی رنگ آمیزی شده با رودامین B و رنگ سبز، گرانول های نشاسته رنگ آمیزی شده با فلورسئین سدیم می باشد.

قرمز نمایان می گردند هم چنین فلورسئین نمونه ها به میزان مطلوبی افزایش می یابد. با افزایش زمان به حدود 2 و 3 ساعت (به ترتیب شکل های 3-ج و 3-د) به دلیل مدت زمان طولانی قرارگیری رنگ روی نمونه ها¹ و همپوشانی بیش از حد آنها² هاله قرمز رنگی بر روی گرانول های نشاسته ایجاد می گردد و علاوه بر آن با گذراندن 2 ساعت لکه های قهوه ای رنگ در نمونه افزایش یافته که منجر به کاهش کیفیت تصویر می گردد. لذا بعد از انجام این آزمون مشخص گردید که زمان استراحت یک ساعت (شکل 3-ب) بهترین زمان برای گرفتن تصاویر مطلوب می باشد.

3-5- آزمون تعیین نوع فیلتر

نتایج مشاهدات میکروسکوپی مربوط به بررسی نوع فیلتر در شکل 4 نشان داده شده است. در این شکل تصویر الف مربوط به فیلتر MWBV2 (طیف نوری 420 نانومتر) و تصویر ب مربوط به فیلتر MWG2 (طیف نوری 510 نانومتر) می باشد. در مورد فیلتر MWIY2 (طیف نوری 560 نانومتر) تصویر بدست آمده از کیفیت بسیار پائینی برخوردار بود طوریکه هاله ای کاملاً قرمز رنگ سطح تصویر را می پوشاند لذا تصویر در اینجا ارائه نشده است. همانطوری که از شکل مزبور نیز مشخص می گردد فیلتر برانگیزاننده MWBV2 (طیف نوری 420 نانومتر) نسبت به فیلتر MWG2 (طیف نوری 510 نانومتر) تصویر میکروسکوپی بهتری ارائه داد و خطای مربوط به پوشش زمینه ای رنگ قرمز در آن دیده نشد. در صورتیکه در فیلتر مربوط به طیف نوری 510 وجود مناطق با رنگ قرمز به سبب نوع فیلتر مورد استفاده مانع از تشخیص واقعی فاز پروتئینی در نمونه خمیر گردید (شکل 4-ب). این

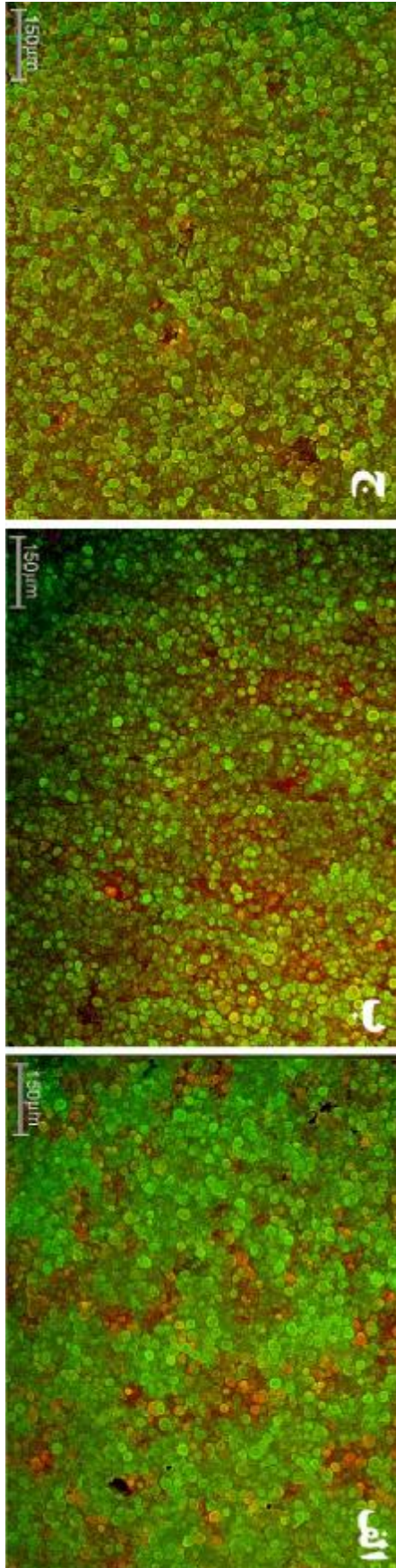
1. Over staining
2. Overlapping

همانطور که از شکل 5-الف ملاحظه می شود توده های گلوتهی در خمیرهای با زمان مخلوط کردن کوتاه به صورت پراکنده و منفک از هم تشکیل می شوند که این مقدمه ای بر تشکیل شبکه گلوتهی در مراحل بعدی خواهد بود. این نتایج با مشاهدات پیغمبردوست و همکاران (2006) [9] با روش میکروسکوپ روبنده کونفوکال لیزری تطابق دارد. همچنین کیفیر و اشتاین (1999) [20] نیز در مطالعات خود به این نتیجه رسیده اند که شروع مخلوط کردن خمیر به دلیل جداسدن موضعی فاز گلوتهن از نشاسته همراه با پیدایش توده های پراکنده و گسسته گلوتهی در خمیر می باشد.

با افزایش زمان مخلوط کردن توده های پراکنده گلوتهی به هم پیوسته و تشکیل یک شبکه سه بعدی را می دهند که گرانول های نشاسته را در بر می گیرد. شکل 5-ب نشان دهنده ریز ساختار خمیر در زمان مخلوط کردن بهینه می باشد. توسعه گلوتهن موجود و پخش یکنواخت و همگن آن به وضوح قابل مشاهده است. اگر عملیات مخلوط کردن بعد از توسعه بهینه ادامه یابد انتظار تخریب ساختار سه بعدی شبکه گلوتهی می رود که این امر در شکل 5-ج به وضوح دیده می شود. همانطور که از این تصویر دیده می شود شبکه گلوتهن در اثر زمان طولانی مخلوط کردن متلاشی می گردد و به صورت توده های ریز در می آید که لابلای گرانولهای نشاسته توزیع می گردد. خمیری که به مدت 40 دقیقه بطور مداوم مخلوط شده است فاقد ساختار گلوتهی پیوسته می باشد. چنین خمیرهایی ارزش تکنولوژیکی نداشته و بسیار چسبنده بوده و ظاهر درخشان دارند که به نام خمیرهای بیش از حد مخلوط شده موسوم هستند.

4- نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این مطالعه با میکروسکوپ EFLM مشابه نتایج حاصله از یافته های پیغمبردوست و همکاران (2006) [9] با میکروسکوپ CSLM می باشد. نتایج حاصل بیانگر این مطلب است که میکروسکوپ EFLM جایگزین بسیار مناسبی برای میکروسکوپ CSLM در بررسی نمونه های خمیر بوده و تصاویر آن با تصاویر برداشت شده توسط میکروسکوپ کونفوکال برابری می کند، در حالی که هزینه و زمان کمتری را در بررسی نمونه ها صرف می کند. از سوی دیگر به علت تفکیک مناسب رنگ و میدان دید وسیع، تخریب فلورسنس نمونه ها بسیار پایین تر است. با توجه به این که میکروسکوپ اپی فلورسنس در مقایسه با میکروسکوپ الکترونی روبنده، از طریق گوناگونی رنگ، تفکیک ریز ساختارها را



شکل 5 ریزساختار نمونه های خمیر به دست آمده در زمان های مختلف مخلوط کردن: الف) زمان مخلوط کردن کم (under-mixing) ب) زمان مخلوط کردن مطلوب (Optimal mixing) ج) زمان مخلوط کردن بیش از حد (Over-mixing)

- characteristics of nondeveloped, partially developed, and developed doughs. *Cereal Chem.* 78(4): 447-452.
- [9] Peighambaroust 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: 183-97.
- [10] Unbehend L., Lindhauer M.G., Meuser F., 2004. Physical and microscopic studies of flour-water systems. *European Food Research and Technology.* 219: 514-21.
- [11] Schluentz E.J., Steffe J.F., Ng P.K.W., 2000. Rheology and microstructure of wheat dough developed with controlled deformation. *Journal of Texture Studies.* 31: 41-54.
- [12] Herman, B. 1998. *Fluorescence Microscopy.* 2nd Ed. Bios Scientific Publishers. North Carolina University Inc..
- [13] Harris. N. and Poarka. K.J. 1994. *Plant Cell biology: a practical approach.* Oxford University Press Inc. NY.
- [14] McDonough, C. M. and Rooney, L. W. 1999. Use of the environmental scanning electron microscope in the study of cereal-based foods. *Cereal Foods World,* 44, 342-348.
- [15] Roman-Gutierrez, A. D., S. Guilbert and B. Cuq. 2002. Description of microstructure changes in wheat flour and flour components during hydration by using Environmental Scanning Electron Microscopy. Elsevier Science Ltd.
- [16] Van Der Voort, H. T. M., Brakenhoff, G. J., Valkenburg, J. A. C., and Nanninga, N. 1985. Design and use of a computer controlled confocal microscope for biological applications. *Scanning* 7: 66-78.
- [17] Amend T., Belitz H.D., Moss R., Resmini P. 1991. Microstructural studies of gluten and a hypothesis on dough formation. *Food Structure,* 10: 277-288.
- [18] Calderon-Dominguez G., Neyra-Guevara M., Farrera-Rebollo R., Arana-Erasquin R., Mora-Escobedo R. 2003. Structural and farinographic change during mixing of a yeast sweet dough. *Nahrung-Food,* 47: 312-319.
- [19] Moss R., Gore P.J., Murray I.C. 1987. The influence of ingredients and processing variables on the quality and microstructure of Hokkien, Cantonese and instant noodles. *Food Microstructure,* 6: 63-74.
- [20] Kieffer R., Stein N. 1999. Demixing in wheat dough – Its influence on dough and gluten rheology. *Cereal Chemistry,* 76: 688-693.
- به نحو مطلوب تری انجام می دهد می توان آن را بر میکروسکوپ الکترونی روبنده که تصاویر سیاه سفید (مونوکروم) می دهد ارجح دانست.
- ## 5- تشکر و قدردانی
- نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه تبریز برای تأمین منابع مالی انجام این پژوهش، مدیریت محترم گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی برای در اختیار گذاشتن امکانات میکروسکوپ نوری اپی فلورسنس و مدیریت و همکاران محترم هیأت علمی گروه علوم و صنایع غذایی به جهت حمایت و همفکری در انجام این پژوهش اعلام می دارند.
- ## 6- منابع
- [1] Bloksma, A.H., W. Bushuk. 1988. Rheology and chemistry of dough. In: Pomeranz Y, editor. *Wheat: chemistry and technology.* St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists; p. 131-218.
- [2] Campos, D.T., J.F. Steffe, P.K.W. Ng. 1996. Mixing wheat flour and ice to form undeveloped dough. *Cereal Chemistry.* 73: 105-7.
- [3] Bache, I.C., and A.M. Donald. 1998. The structure of the gluten network in dough: a study using Environmental Scanning Electron Microscopy. *Cereal Science.* 28: 127-133
- [4] Paredes-lopez, O. and Bushuk W. 1982. Development and undevelopment of wheat dough by mixing: microscopic structure and its relation to bread-making quality. *Cereal Chem.* 60: 24-27
- [5] Hug-Iten, S., S. Handschin, B. Conde-Petit and F. Escher. 1999. Changes in starch microstructure on baking and staling of wheat bread. Institute of Food Science, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), CH-8092 Zurich.
- [6] Zounis, S., K. J. Quail, M. Wootton and M. R. Dickson. 2002. Studying frozen dough structure using Low-Temperature Scanning Electron Microscopy. *Journal of Cereal Science,* 35: 135-147
- [7] Letang, C., M. Piau, C. Verdier. 1999. Characterization of wheat flour-water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. *Journal of Food Engineering* 41: 121-132.
- [8] Lee, L., P. K. W. Ng, J. H. Whallon and J. F. Steffe. 2001. Relationship between rheological properties and microstructural