

بررسی تأثیر افزودن بیوسورفکتانت بر خواص رئولوژیکی خمیر نان بربری

هانیه صادقی^{a*}، حمید راشدی^b، مهناز مظاهری اسدی^c، وحیده مرادی^d، عاطفه صادقی^e

^a کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^b استادیار دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده های فنی دانشگاه تهران

^c دانشیار گروه بیوتکنولوژی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران

^d کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^e کارشناس زیست شناسی- میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنجند

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۴/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۴/۲۷

چکیده

مقدمه: نان به عنوان مهمترین منبع تأمین کننده انرژی و پروتئین بسیاری از مردم جهان نظیر ایران مطرح است. در تولید صنعتی نان، خواص رئولوژی خمیر بسیار مهم است. گروهی از ترکیبات شیمیایی صنعتی تقویت کننده های خمیر هستند که عوامل فعال در سطح (سورفکتانت) می باشند. این ترکیبات در تهیه خمیر استفاده می شوند تا خمیری با خواص مطلوب حاصل شود. به طور کلی تأثیر این اجزا بر رئولوژی خمیر کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. افزایش آگاهی در میان مصرف کنندگان عامل مؤثری در افزایش درخواست برای ترکیبات غذایی و افزودنی های طبیعی به جای ترکیبات شیمیایی است. در عصر جدید و با توسعه فناوری بیوتکنولوژی، گروهی از سورفکتانت های طبیعی با منشأ میکروبی تحت عنوان بیوسورفکتانت (Biosurfactant) مطرح می گردد که در این پژوهش بررسی تأثیر بیوسورفکتانت (امولسان) بر خواص رئولوژیکی خمیر نان بربری بررسی شد.

مواد و روش ها: امولسان از باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* تولید و با روش سولفات آمونیوم استخراج شد. سپس در سطوح ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد به آرد گندم اضافه گردید و ویژگیهای رئولوژیکی آن با ویژگیهای خمیر آرد شاهد توسط دستگاههای فارینوگراف و اکستنسوگراف مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت.

یافته ها: بیوسورفکتانت (امولسان) از باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* به میزان ۱/۴۹ گرم در هر لیتر محیط کشت تولید شد. طبق نتایج بدست آمده، با افزودن بیوسورفکتانت جذب آب در آردهای حاوی امولسان از ۵۹/۹ در نمونه شاهد به ۶۱/۳، ۶۳/۴، ۶۵/۲، ۶۷/۵، ۶۸/۲ به ترتیب در تیمارهای ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد می رسد. آزمایشات نشان داد که زمان گسترش خمیر نان بربری هنگام استفاده از بیوسورفکتانت نسبت به نمونه شاهد بیشتر است به طوری که از ۳/۳۵ در نمونه شاهد به ۳/۴۵، ۴، ۴/۵۵، ۴/۶۰ و ۴/۷۵ به ترتیب در نمونه های حاوی ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد امولسان افزایش یافته است. همچنین طبق نتایج تیمار امولسان در مقایسه با نمونه شاهد به طور معنی داری کشش پذیری و پایداری خمیر نان بربری را افزایش می دهد به این ترتیب که میزان پایداری از ۳/۲۵ در نمونه شاهد به ۳/۳۵، ۴/۰۵، ۵/۵۵، ۵/۶۰ و ۵/۹۵ به ترتیب در نمونه های ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد افزایش یافته است.

نتیجه گیری: خمیر نان بربری تهیه شده با بیوسورفکتانت قوی تر بوده و پایداری بیشتری را نسبت به خمیر شاهد نشان می دهد. بهترین نتایج از استفاده ۰/۵ درصد بیوسورفکتانت (امولسان) حاصل شده است.

واژه های کلیدی: امولسان، بیوسورفکتانت، ویژگیهای رئولوژیکی خمیر

مقدمه

نان به عنوان مهمترین منبع تأمین کننده انرژی و پروتئین بسیاری از مردم جهان نظیر ایران مطرح است و اهمیت این محصول بر کسی پوشیده نیست (قارونی، ۱۳۸۲). نان به عنوان یک غذای پایه همواره مطرح می باشد. طبق آمار، در کشور ما نان به تنهایی ۸۰٪ از غذای مردم را تشکیل می دهد (پایان، ۱۳۸۰). از گذشته تاکنون نانواها، دانشمندان غلات و محققین، علاقمند به درک و فهم و اندازه گیری خصوصیات اساسی و مکانیکی خمیر آرد گندم بوده اند. این علاقه باعث بوجود آمدن خصوصیات خمیر آرد گندم در قالب رئولوژی خمیر شده است. در تولید صنعتی نان، خواص رئولوژی خمیر بسیار مهم است. با توجه به اهمیت فوق العاده رئولوژی خمیر در تمامی مراحل پخت نان، اصول اساسی رئولوژی هنوز در صنعت نانوايي به کار گرفته نمی شود. یکی از دلایل آن پیچیدگی رئولوژی خمیر است، زیرا خمیر نان نه تنها یک سیستم چند فازی محسوب می گردد بلکه شامل عناصر و اجزاء زیادی بوده که هر کدام بر خواص رئولوژیکی آن تأثیر می گذارند. بسیاری از این خواص رئولوژیکی نتیجه فعل و انفعالات ترکیبات خمیر هستند بطوریکه تقریباً تمامی ترکیبات نان بر آن تأثیر گذار می باشند (جرارد هيسن هاتل، ۱۳۸۱). گروهی از ترکیبات که در صنعت نانوايي کاربرد دارند تقویت کننده های خمیر هستند که عوامل فعال در سطح (سورفکتانت) می باشند. این ترکیبات گروهی از ترکیبات شیمیایی صنعتی اند که از پرکاربردترین مواد در صنایع و فرآورده های مختلف به شمار می روند (Desai and Banat, 1997). سورفکتانها ترکیبات آمفی فیلک می باشند که از دو بخش هیدروفوبیک (غیر قطبی) و هیدروفیلک (قطبی) تشکیل شده اند. به طور کلی تأثیر این اجزا بر رئولوژی خمیر کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است اگرچه توانایی آنها در افزایش مقاومت خمیر نشانگر این مطلب است که این اجزاء بر اجزای الاستیک موجود در خمیر تأثیر می گذارند (Wilson et al., 2004). GMS، SSL، DATEM و پلی سوربات به طور معمول جهت استحکام خمیر استفاده می شوند و در نتیجه خمیر حاوی آن حجیم تر بوده و ساختار مغز محصول بهبود

می یابد (Rosell et al., 2001). بنابراین امولسیفایرها برای تهیه خمیر استفاده می شوند تا خمیری با خواص مطلوب حاصل شود. بیشترین مصرف امولسیون کننده های (سورفکتانت) غذایی مربوط به محصولات نانوايي است. آمارهای جدید نشان می دهند که سالانه حدود ۱۸۰ هزار تن انواع امولسیفایر در صنعت غذا استفاده می شود که حدود ۵۰٪ کل این مقدار مربوط به محصولات نانوايي است. تولید سالانه امولسیون کننده های غذایی از رشدی حدود ۳٪ برخوردار است. اغلب امولسیفایرهای موجود از نوع سنتتیک و شیمیایی می باشند (جرارد هيسن هاتل، ۱۳۸۱). در طی نیم قرن گذشته، علاقه مصرف کنندگان به غذاهای طبیعی یا آنهایی که به کمترین میزان فراوری شده اند، افزایش یافته است. کشف دیوکسان در پلی سوربات و حذف آنها، علت بسیاری از نگرانی ها و اعتراضات مربوط به افزودنی های سنتزی را نشان داده است. در سال ۱۹۹۴ مدلی ابداع شد که به کمک آن تأثیر سورفکتانت ها بر سلول های مخاط معده و روده بررسی می شود. بر این اساس هشدارهایی در مورد احتمال نفوذ امولسیون کننده های غذایی تک زنجیره مانند لیزوفسفاتیدیل کولین و سدیم استارویل لاکتیلات بر این سلولها (مخاط معده و روده) داده شده است. بنابراین افزایش آگاهی در میان مصرف کنندگان عامل مؤثری در افزایش درخواست برای ترکیبات غذایی و افزودنی های طبیعی است. از دیرباز، میکروبها در صنعت غذا برای تولید محصولات کشت داده شده ای مانند ماست و پنیر مورد استفاده قرار می گرفته اند. با توسعه منطقی این تکنولوژی می توان ارگانوسم های با درجه خوراکی^۱ بدست آورد که سورفکتانت های طبیعی (بیوسورفکتانت) تولید کنند. بنابراین در عصر جدید و با توسعه فناوری بیوتکنولوژی دسته دیگری از سورفکتانت های طبیعی با منشأ میکروبی تحت عنوان بیوسورفکتانت (Biosurfactant) مطرح می گردد (Toufeili and Shadarevian, 1995). این ترکیبات توسط میکروارگانوسم های مختلف و با ساختارهای متنوع تولید می شوند. از میان بیوسورفکتانتها تنها رامنولیبیدها^۲ در صنعت نانوايي مورد بررسی قرار گرفته اند (Van Haesendonck and Vanzeveren, 2004). یکی

¹ Food Grade² Rhamnolipids

به صورت اسلنت کشت داده شد. سپس اسلنتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند (Chamanrokh et al., 2008).

- تهیه کشت اولیه (پری کالچر)^۱

بدین منظور، ۱۰۰ سی سی محیط کشت نوترینت برات در ارلنهای ۵۰۰ سی سی تهیه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱ اتمسفر درون اتوکلاو استریل گردید. سپس از محیط کشت استریل و خنک شده تحت شرایط استریل لام تهیه شد و پس از اطمینان از غیر آلوده بودن آن، با ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل، سطح اسلنت شسته و سپس ۳ میلی لیتر از سوسپانسیون به درون لوله کوت دستگاه اسپکتروفوتومتر کالیبر شده ریخته شد و هنگامی که جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ nm به ۱ رسید، ۱ درصد به محیط پری کالچر تلقیح گردید. سپس پری کالچرها روی شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰ rpm در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت و هر چند ساعت (معمولاً ۲ ساعت) OD در ۶۰۰nm اندازه گیری گردید و پس از ۱۷ ساعت در ۶۰۰ nm و انتخاب OD=۱ برای کشت مورد استفاده قرار گرفت (Chamanrokh et al., 2008).

- تهیه کشت

هنگامیکه در طول موج ۶۰۰ نانومتر، OD = ۱ شد، به محیط کشت نمکهای معدنی تهیه شده استریل که هر کدام ۱۰۰۰ میلی لیتر بوده و در ارلنهای ۵۰۰۰ میلی لیتر ریخته شده بودند از روغن سویای استریل و ۵٪ از محیط پری کالچر، تحت شرایط استریل تلقیح شد. سپس ارلنها در شیکر انکوباتور با دور ۲۰۰rpm در دمای ۳۰ درجه به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند (Chamanrokh et al., 2008).

- استخراج فراورده

پس از اتمام زمان اتوگذاری جهت جداسازی باکتریها، محیط کشت با دور ۸۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. سپس به منظور بررسی تولید امولسان در محیط، سوپرناتانت مورد آزمایشهای همولیز اریتروسیتها، خون گوسفند و بررسی توانایی امولسیفیکاسیون قرار گرفت.

دیگر از انواع بیوسورفکتانت‌های غذایی امولسانها می‌باشند. امولسان یک بیوسورفکتانت لیپوپلی ساکاریدی خارج سلولی با وزن مولکولی ۱۰۰۰ کیلودالتون است که از باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* تولید می‌شود. ساختمان این پلیمر از دو قسمت هیدروفیلیک و هیدروفوبیک تشکیل شده است (Goldman et al., 1982). بنابراین انتظار می‌رود که افزودن بیوسورفکتانت (امولسان) به فرمولاسیون خمیر نان بربری، بتواند ویژگیهای رئولوژیکی آن را ارتقاء بخشد، به عبارت دیگر باعث افزایش استحکام و قوت خمیر شده و خواص آن را بهبود دهد. همانگونه که ذکر گردید در رابطه با تأثیر انواع مختلف بیوسورفکتانت تنها تأثیر رامنولیپیدا در این رابطه بررسی شده است. در سال ۲۰۰۴ استفاده از رامنولیپیدا (بیوسورفکتانت) در محصولات نانویی مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تأثیر رامنولیپید در افزایش حجم نان، پایداری خمیر، بهبود بافت پوسته و مغز نان طی فرایند پخت انجام شد. ارزیابی های انجام شده نشان داد که افزودن حدود ۰/۰۲٪ تا ۰/۵٪ (w/w) از رامنولیپید (بیوسورفکتانت) به آرد باعث بهبود استحکام خمیر، افزایش حجم، بهبود بافت و همچنین افزایش پایداری در محصول می‌گردد. بنابر این می‌توان از رامنولیپیدا (بیوسورفکتانتها) به عنوان جایگزین سورفکتانت‌های شیمیایی استفاده نمود (Van Haesendonck and Vanzeveren, 2004).

در تحقیق حاضر تأثیر افزودن بیوسورفکتانت (امولسان) بر روی خواص رئولوژیکی خمیر نان بربری مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در فرمولاسیون آن، سطوح ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد (w/w) از این بیوسورفکتانت استفاده شد که ضمن بررسی تأثیر آن بر خصوصیات رئولوژیکی، تعیین میزان درصد بهینه آن نیز از اهداف این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش ها

- میکروارگانیسم مورد استفاده

میکروارگانیسم استفاده شده برای تولید امولسان *Acinetobacter calcoaceticus* بود که از مرکز کلکسیون میکروارگانیسمهای عفونی و صنعتی ایران دریافت شد. باکتری در محیط Nutrient Agar در لوله

¹ Preculture

تأثیر افزودن بیوسورفکتانت بر خواص رئولوژیکی خمیر نان بربری

عفونی و صنعتی ایران، سویه کشت داده شده بر روی اسلنت مورد بررسی مورفولوژیکی قرار گرفت. به منظور بررسی تولید امولسان در محیط کشت، سوپرناتانت مورد آزمایشهای همولیز اریتروسیتهای خون گوسفند و بررسی توانایی امولسیفیکاسیون و کشش سطحی قرار گرفت (Chamanrokh et al., 2008; Francy, 1997).

بررسی فعالیت همولیتیک که به وجود بیوسورفکتانتها نسبت داده می شود به علت سادگی و سرعت بالا و عدم نیاز به امکانات پیچیده آزمایشگاهی به عنوان یکی از معیارهای انتخاب اولیه باکتریهای مولد بیوسورفکتانت مورد استفاده قرار گرفت. این کار به منظور اثبات تولید امولسان با استفاده از ویژگی همولیز اریتروسیتهای خون گوسفند صورت گرفت. بیوسورفکتانتها از جمله متابولیتهایی هستند که به دلیل توانایی تخریب غشاء گلبول قرمز در محیطهای خون دار ایجاد همولیز می کنند (Rosenberg and Ron, 1999; Chamanrokh et al., 2008).

در این تحقیق از روش چاهک آغشته به محیط کشت حاوی امولسان استفاده شد. در پلیتهای Blood Agar حاوی خون دفیبرینه گوسفند چاهکهایی ایجاد شد. سپس محیط کشت حاوی امولسان در آن ریخته و در حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شد (شکل ۱).

کشش سطحی به روش Du Nouy Ring Method و با استفاده از دستگاه تنسیومتر Kruss مدل K12 اندازه گیری شد. دستگاه دارای حلقه ای از جنس پلاتین است که در مایع (محیط کشت و سوپرناتانت) غوطه ور می شود. در این هنگام نیروی وارد بر این حلقه روی صفر تنظیم می گردد. سپس حلقه به آرامی از درون مایع به خارج کشیده می شود. نیرویی که هنگام خارج کردن حلقه از سطح مایع توسط دستگاه ثبت شده است (حداکثر نیروی ثبت شده) به عنوان کشش سطحی در نظر گرفته می شود (Gutnick and Moshav, 1989).

پس از ایجاد نتایج مطلوب در آزمایشهای تشخیصی فوق، جهت استخراج امولسان از روش سولفات آمونیوم استفاده شد. برای این منظور حدود ۵۰ درصد سولفات آمونیوم اشباع به سوپرناتانت افزوده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه قرار داده شد. با افزودن سولفات آمونیوم، امولسان رسوب کرده، از طریق سانتریفیوژ جدا شد. رسوب حاصل در ۲ میلی لیتر محلول بافر فسفات قرار گرفت. پس از این مدت، رسوب حاصل مجدداً از طریق سانتریفیوژ (۸۰۰۰ rpm به مدت ۴۰ دقیقه) جدا شده و با روش لیوفیلیزاسیون خشک شد (Gutnick and Moshav, 1989).

- خالص سازی امولسان

پودر امولسان در دستگاه سوکسله با دی اتیل اتر به صورت خالص درآمد (Gutnick and Moshav, 1989).

- آزمایشات رئولوژیکی خمیر

ویژگی های فیزیکوشیمیایی آرد مورد استفاده در جدول ۱ مشخص گردیده است. ویژگیهای رئولوژیکی خمیرهای تهیه شده از آرد شاهد و تیمارهای حاوی ۰/۵، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵، و ۱ درصد (w/w) امولسان، توسط دستگاه فارینوگراف و اکستنسوگراف برابندر و به ترتیب، مطابق با روش AACC شماره های ۵۴-۲۱ و ۵۴-۱۰ تعیین شدند (AACC, 1995).

تجزیه و تحلیل آماری

طرح آماری در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در دو تکرار انجام گرفت. جهت مقایسه میانگینها و بررسی اثرات ساده و متقابل تیمارها از آزمون دانکن استفاده شد و نرم افزار SPSS در این آزمونها بکار برده شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

یافته ها

پس از تهیه باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* از مرکز کلکسیون میکروارگانیسمهای

جدول ۱- ویژگی های فیزیکی و شیمیایی آرد

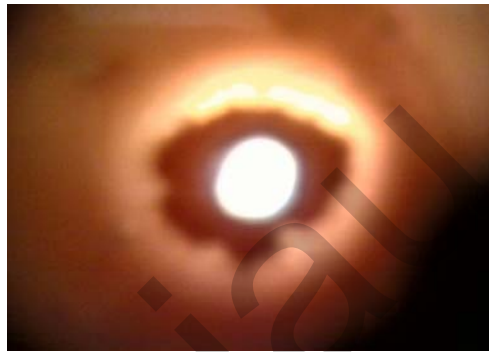
رطوبت	خاکستر	پروتئین	گلو تن مرطوب	گلو تن خشک	ایندکس گلو تن	عدد زلنی	عدد فالینگ
۱۳/۲۰ درصد	۰/۷۳ درصد	۱۱/۰۲ درصد	۲۶/۹ درصد	۰/۸۷ درصد	۷۷/۸۷ درصد	۱۹/۵ میلیمتر	۴۹۰ ثانیه

امولسیفیکاسیون با تقسیم طول لایه روغن استریفیه شده نسبت به طول کل محلول $100 \times$ بدست آمد. برای هر نمونه یک شاهد (محیط فاقد باکتری) در نظر گرفته شد (Francy, 1997). نتایج حاصل در جدول ۲ آورده شده است.

از آنجا که قبل از پروسه استخراج، تولید امولسان از طریق روشهای فوق به اثبات رسید لذا در این مرحله استخراج به روش سولفات آمونیوم انجام شد (Chamanrokh et al., 2008).

نتایج آزمون فارینوگراف در جدول ۳ گزارش شده است. نتایج تأثیر بیوسورفکتانت (امولسان) بر روی پارامترهای آزمون اکستنسوگراف در جدول ۴ و نمودار ۱ آمده است.

توانایی امولسیفیکاسیون مقیاسی است که توانایی بیوسورفکتانت در امولسیونه کردن هیدروکربنهای مختلف (روغن سویا) را نشان می دهد. علاوه بر دو فاکتور کشش سطحی و همولیز اریتروسیتهای خون گوسفند، بررسی توانایی بیوسورفکتانت در پایدار نمودن امولسیونهای آب نیز یک اندیکاتور متداول از فعالیت سطحی بیوسورفکتانت محسوب می شود جهت بررسی توانایی امولسیفیکاسیون از روش Goldenberg Cooper و از لوله‌های با قطر یکسان استفاده شد. برای این منظور در هر لوله به میزان ۲ میلی لیتر سوپرناتانت ریخته و مقادیر ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی لیتر روغن سویا به آنها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۳۰ درجه قرار گرفت. ضریب



شکل ۱- هاله همولیز ایجاد شده در محیط Blood Agar

جدول ۲- فعالیت امولسیفیکاسیون

روغن سویا (میلی لیتر)	۰/۵	۱	۱/۵	۲
درصد فعالیت امولسیفیکاسیون محیط کشت حاوی بیوسورفکتانت	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

جدول ۳- آزمون فارینوگراف*

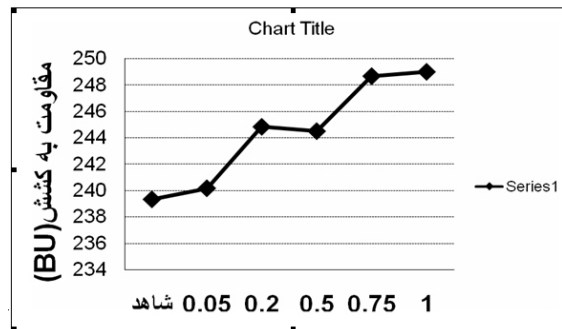
میزان جذب آب (%)	زمان گسترش خمیر (دقیقه)	زمان مقاومت خمیر (دقیقه)	درجه سست شدن خمیر پس از ۱۰ دقیقه	درجه سست شدن (۲۰ دقیقه)	ارزش والوریمتری
شاهد	۵۹/۵	۳/۳۵ ^{cd}	۳/۲۵ ^c	۷۳ ^c	۹۰ ^b
تیمار ۰/۰۵	۶۱/۳ ^c	۳/۴۵ ^d	۳/۳۵ ^c	۷۳ ^c	۸۷/۵ ^b
تیمار ۰/۲	۶۳/۴ ^b	۴ ^b	۴/۰۵ ^b	۵۹/۵ ^b	۷۶/۵ ^{ab}
تیمار ۰/۵	۶۵/۲ ^a	۴/۵۵ ^{ab}	۵/۵۵ ^a	۴۶ ^a	۶۵ ^a
تیمار ۰/۷۵	۶۷/۵ ^a	۴/۶ ^a	۵/۶ ^a	۴۴/۵ ^a	۶۱/۵ ^a
تیمار ۱	۶۸/۲ ^a	۴/۷۵ ^a	۵/۹۵ ^a	۴۳/۵ ^a	۶۱ ^a

*حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در سطح $p < 0.05$ در هر ستون می باشد.

جدول ۴- ارتباط بیوسورفکتانت (امولسان) و انرژی صرف شده جهت کشش خمیر

نمونه	شاهد	تیمار ۰/۰۵	تیمار ۰/۲	تیمار ۰/۵	تیمار ۰/۷۵	تیمار ۱
انرژی (سانتیمتر مربع)	۴۳/۶۷	۴۷/۶۷	۴۸/۱۷	۴۸/۰۰	۴۸/۵۰	۴۹/۶۷

تأثیر افزودن بیوسورفکتانت بر خواص رئولوژیکی خمیر نان بربری



نمودار ۱- رابطه سطوح مختلف بیوسورفکتانت (امولسان) بر روی مقاومت به کشتش خمیر

بحث

پس از کشت باکتری بر روی اسلنت و بررسی مورفولوژیکی صحت خالص بودن باکتری فوق تأیید گردید. وجود هاله بی رنگ در اطراف چاهک در آزمون همولیز اریتروسیت‌های خون گوسفند به عنوان فعالیت همولیتیک مثبت در نظر گرفته شد. با توجه به نتایج حاصل از آزمون کشتش سطحی، *Acinetobacter calcoaceticus* قادر به کم کردن کشتش سطحی تا مقادیر کمتر از ۴۰mN/m بوده که نشان دهنده تولید بیوسورفکتانت (امولسان) می باشد. همچنین طبق نتایج ارائه شده فعالیت امولسیفیکاسیون به طور هماهنگ با رشد باکتری و افزایش بیوماس، افزایش پیدا کرده و با گذشت ۴۴-۴۸ ساعت از رشد باکتری، در زمان ۷۲ ساعت به حداکثر میزان خود (۱۰۰٪) رسیده و از این نقطه به بعد در اندازه ثابتی باقی می ماند. این نتایج نشان می دهد که بیوسورفکتانت در سویه مورد نظر (RAG-1) یک متابولیت اولیه است که تولید آن نیز همراه با تولید و افزایش بیوماس سلولی، افزایش می یابد. به این ترتیب پس از تأیید تولید و حضور امولسان از هر لیتر محیط کشت ۱/۴۹ گرم امولسان استخراج شد.

با توجه به داده های آزمون فارینوگراف در جدول ۳، استفاده از بیومولسیفایر (امولسان) در سطوح مختلف باعث افزایش جذب آب فارینوگراف آرد گندم شده است. به طوریکه درصد جذب آب از ۵۹/۹ در نمونه شاهد به ۶۱/۳، ۶۳/۴، ۶۵/۲، ۶۷/۵ و ۶۸/۲ به ترتیب در تیمارهای ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد می رسد. خمیرهایی که برای رسیدن به حد معینی از ویسکوزیته و قوام آب بیشتری جذب کنند و خمیر حاصل از آن دارای الاستیسیته زیاد

باشد برای تولید نان مناسب تر بوده و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه تر می باشند. افزایش جذب آب سبب بروز تغییراتی در محصول نهایی می شود که عبارتند از: افزایش زمان ماندگاری با مرطوب نگه داشتن نان و کاهش نسبی از دست رفتن رطوبت فراورده در حین پخت (Wilson *et al.*, 2004). از دیگر نتایج بدست آمده از منحنی فارینوگراف می توان به افزایش پارامترهای رئولوژیکی نظیر زمان گسترش خمیر و پایداری آن اشاره کرد. بطوریکه با بالا رفتن سطوح بیومولسیفایر زمان گسترش و پایداری خمیر بیشتر می شود. زمان مورد نیاز برای رسیدن به گسترش یا توسعه کامل خمیر با افزودن بیومولسیفایر (امولسان) افزایش می یابد و بین تیمارهای مختلف از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$). بین شاهد و نمونه ۰/۲ اختلاف معنی دار نمی باشد بنابراین استفاده از ۰/۲ درصد امولسان تفاوتی در زمان گسترش خمیر نسبت به نمونه شاهد ایجاد نکرده است، در حالیکه نمونه های حاوی ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد امولسان بیشترین زمان گسترش را نسبت به سایر نمونه ها در خمیر ایجاد کرده اند و بین آنها اختلاف معنی داری وجود ندارد ($p > 0.05$). پایداری خمیر نیز با افزایش سطوح بیومولسیفایر افزایش می یابد و بین نمونه شاهد با نمونه های حاوی امولسان اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < 0.05$). نمونه های ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ در یک گروه قرار گرفته و با اختلاف معنی داری نسبت به سایر نمونه ها سبب افزایش پایداری خمیر شدند ($p < 0.05$). این نتایج در تطابق با یافته های باسیل و همکاران می باشد و نشان می دهد که امولسان نیز مانند سورفکتانت های DATEM^۱، CSL^۱، SSL^۲ و EMG^۲ سبب^۳ افزایش پایداری خمیر خواهد شد (Basil and

^۱ Calsium stearyl lactylate

^۲ Ethoxylylated mono glyceride

(Kamel, 1993). فاکتورهای زمان گسترش و پایداری بیانگر بهبود کیفیت آرد می‌باشند، بطوریکه مقاومت آن در برابر تغییرات حاصله طی تهیه خمیر و فرایند پخت بیشتر بوده و می‌تواند ساختمان بهتر و یکنواخت تری را ایجاد کند. از آنجا که در خمیر امولسیفایرها موجب کم شدن تورم نشاسته و زیاد شدن دمای ژلاتینه شدن آن شده و نیز به دلیل تشکیل پیوند با لیپوپروتئین‌ها و افزایش استحکام آنها ساختار گلوتن را نیز تقویت کرده و موجب نگهداری بهتر گاز در شبکه گلوتن می‌شوند (جرارد هیسن هاتل، ۱۳۸۱). بنابراین به نظر می‌رسد این بیوامولسیفایر نیز به همین ترتیب شبکه گلوتن را تقویت کرده، باعث افزایش استحکام شبکه و خصوصیات آرد می‌شود. درجه سست شدن خمیر پس از زمانهای ۱۰ و ۲۰ دقیقه با افزودن سطوح مختلف بیوسورفکتانت (امولسان) کاهش یافته و بین گروه شاهد و تیمارهای حاوی امولسان اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$). در زمان ۱۰ دقیقه بین گروه شاهد و تیمار ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. تیمار ۰/۲ در درجه دوم قرار گرفته و تأثیر آن از تیمارهای ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ کمتر می‌باشد، در حالیکه تیمارهای ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ در یک گروه قرار گرفته و با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر نمونه‌ها سبب کاهش درجه سست شدن خمیر شدند ($p < 0.05$). با توجه به اینکه هر سه نمونه دارای تأثیر مشترکی بر خمیر بوده و در یک گروه قرار دارند به نظر می‌رسد که استفاده از نمونه ۰/۵ علاوه بر تأثیر قابل ملاحظه‌ای در کاهش درجه سست شدن خمیر، از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه‌تر می‌باشد. کاهش درجه سستی نشانگر افزایش تحمل خمیر نسبت به اختلاط است و این افزایش در تیمارهای حاوی بیوامولسیفایر کاملاً بارز است. یکی از مهمترین فاکتورهای اندازه‌گیری شده در فراینوگراف، ارزش نانوائی یا والوریمتری آرد است. به این مفهوم که آرد مورد استفاده تا چه اندازه قابلیت پخت و تولید نان را دارا است. با افزودن بیوامولسیفایر (امولسان) ارزش والوریمتری آرد افزایش می‌یابد. بین گروه شاهد و نمونه حاوی امولسان اختلاف معنی‌دار دیده می‌شود ($p < 0.05$). در حالیکه طبق تحقیقات انجام شده در رابطه با بررسی تأثیر منوگلیسرید و لستین (سورفکتانت) برخواص رئولوژیکی خمیر نان‌های مسطح، با استفاده از این ترکیبات افزایش معنی‌داری در ارزش والوریمتری ایجاد نشده است

(Azizi *et al.*, 2003). بنابراین می‌توان به تأثیر بهتر بیوسورفکتانت نسبت به سورفکتانت‌ها دست یافت. داده‌های آزمون اکستنسوگراف در نمودار ۱ نشان می‌دهد که مقاومت به کشش در خمیر با افزایش درصد بیوامولسیفایر (امولسان) افزایش می‌یابد. افزایش مقاومت به کشش نشان دهنده افزایش پایداری در خمیر می‌باشد. مخلوط کردن خمیر باعث ایجاد اتصالات گلوتن/گلوتن از طریق ایجاد پلهای دی سولفیدی می‌شود. معمولاً این پلهای به صورت کامل ایجاد نشده و خمیر تولید شده ساختمان ضعیفی دارد. گاز ایجاد شده توسط مخمرها از طریق لایه‌های گلوتهی ضعیف خارج می‌شوند. سلولهایی که دیواره گلوتهی ضعیفی دارند تخریب شده و به یکدیگر می‌چسبند (جرارد هیسن هاتل، ۱۳۸۱). از آنجا که سورفکتانت‌ها تعداد اتصال گلوتن/گلوتن را افزایش داده و پلهای دی سولفیدی را تقویت کرده و به این ترتیب باعث تراکم شبکه گلوتن و تقویت خمیر می‌شوند (جرارد هیسن هاتل، ۱۳۸۱). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از بیوسورفکتانت نیز به همین طریق، مقاومت به کشش را افزایش داده و با استفاده از آن خمیری حاصل می‌شود که مقاومت بیشتری در مقابل کشش دارد. بر طبق داده‌های ارائه شده، قابلیت کشش خمیر در زمانهای ۴۵، ۹۰ و ۱۳۵ دقیقه با افزایش درصد بیوامولسیفایر (امولسان) کاهش می‌یابد. بین سطوح مختلف و نمونه شاهد از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. کشش پذیری بیانگر مقدار کشش خمیر و نشان دهنده خواص نگهداری آب و گاز در خمیر می‌باشد که در کاهش بیباتی و حفظ تازگی نان مؤثر است. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که مساحت سطح زیر منحنی اکستنسوگراف با افزودن سطوح مختلف بیوامولسیفایر افزایش می‌یابد. نسبت مقاومت به کشش و سطح زیر منحنی نشان دهنده انرژی مصرف شده برای کشش خمیر می‌باشد. به دلیل افزایش مقاومت به کشش خمیر، مقدار انرژی افزایش می‌یابد (جدول ۴). این نتایج مطابق با یافته‌های متلر و همکاران می‌باشد. محققان تأثیر DATEM, SSL, CSL و پلی سوربات را بر روی خمیر مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که استفاده از این ترکیبات موجب افزایش استحکام خمیر می‌شود (Mettler and Seibel, 1993).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان دادند که میزان ۰/۵ درصد بیوامولسیفایر (امولسان) با تفاوت آماری معنی داری نسبت به گروه شاهد سبب بهبود خصوصیات رئولوژیکی خمیر شده است. به عبارت دیگر امولسان باعث افزایش استحکام، پایداری و قوت خمیر شده و خواص آنرا بهبود می بخشد که این نتایج مطابق با یافته‌های Kachholz و Schlingmann در سال ۱۹۸۷ می باشد بنابراین بیوسورفکتانت (امولسان) می تواند به عنوان یک ماده افزودنی بیولوژیک و جدید جابگرینی برای امولسیفایرهای سنتتیک و شیمیایی در جهت بهبود کیفیت خمیر و نان گندم مورد توجه قرار گیرد. در رابطه با بررسی تأثیر انواع دیگر بیوسورفکتانتها در خصوصیات رئولوژیکی خمیر و سطوح مختلف استفاده از آن ها در انواع مختلف نان و سایر محصولات صنایع پخت به تحقیقات بیشتری نیاز داریم.

منابع

- Desai, J. D. & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants & their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol.* 61(1): 47-64. Eng, S. (1972). U. S. Patent 3,636,017, January 18.
- Goldman, S., Shabti, Y., Rubinovitz, C. & Rosenbery, E. (1982). Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: Distribution of Cell-Free and Cell-Associated Cross-Associated Cross-Reacting Material. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(1), P: 165-170
- Gutnick, D. & Moshav, S. H. (1989). Bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *United States Patent* 4883757.
- Francy, D. (1997). Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of Industrial. Microb.* 8: 237-246.
- Kachholz, T. & Schlingmann, M. (1987). Possible food and agricultural applications of microbial surfactants: an assessment. In N. Kosaric, W. L. Carns, & N. C. C. Gray (Eds.), *Biosurfactants and biotechnology* (pp.183-210). New York: Maecel Dekker
- Mettler, E. & Seibel, W. (1993). Effects of emulsifier and hydrocolloids on whole wheat bread quality; *Cereal Chemistry*, 373-380.
- Rosell, C. M., Rojas, J. A., Benedito, D. & Barber, C. (2001). Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality; *Food hydrocolloids*. 15: 75-81.
- Rosenberg, E. & Ron, E. Z. (1999). High and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:154-162.
- Toufeili, I. & Shadarevian, S. (1995). Effect of shortening and surfactant on selected chemical-physicochemical parameters and sensory quality of Arabic bread; *Food Chemistry*: 253-258.
- Van Haesendonck, I. P. H. & Vanzeveren, E. C. A. (2004). Rhamnolipids in bakery products. W.O. 2004/040984, *International application patent* (PCT).
- Wilson, R. H., Goodfellow, B. J. & Belton, P. S. (2004). Influence of salt on dough rheology and bread quality; *Journal of Food Science*. 22: 96-105.
- جرارد هیسن هاتل، ر. (۱۳۸۱). امولسیون کننده های غذایی و کاربرد آنها. ترجمه محسن ضیائیان-تهران: آرون. صفحات: ۱۸-۲۰، ۲۷۷، ۲۸۱، ۳۵۰.
- قارونی، ج. (۱۳۸۲). تکنولوژی نانهای مسطح، ترجمه حجتی، م. و عزیزی، م. ح. نشر اندیشمند، صفحه: ۳.
- AACC. (1995). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. Methods 54-10, 54-21. The Association: ST. Paul, Minnesota, USA.
- Azizi, M. H., Rajanzade, N. & Riahi, E. (2003). Effect of monodiglyceride and lecithin on dough rheological characteristics and quality of flat bread. *Lebensm-wiss.U.Technol.* 36:189-193.
- Basil, S. & Kamel, S. (1993). Surfactant in Bakery Foods, *Surfactant-technical Bulletin*: 1-2
- Chamanrokh, P., Mazaheriassadi, M., Noohi, A. & Yahyani, S. (2008). Emulsan analysis produced by locally isolated bacteria and *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1. Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng., 5(2): 101-108.