اثر فشار ایزو استاتیک بالا برفعالیتهای متابولیکی و ریخت شناسی مخمر *Saccharomyces cerevisiae*

سید علی مرتضوی[1*]، عبدالمجید مسکوکی[2] ، امیر قندی[3]، آرش کوچکی[3]، جواد باروئی[3]

۱- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۲- مربی، علمی پارک علم وفناوری خراسان

۳- دانش‌آموخته کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

استفاده از فشار ایزو استاتیک بالا در تحقیقات بیولوژیک و مواد غذائی در دهه اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است. در این پژوهش به منظور بررسی اثر فشار ایزو استاتیک بر فعالیت متابولیکی مخمر ابتدا سویه خالص تجارتی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* را به مدت ۵، ۱۰و۱۵ دقیقه تحت فشارهای ۵۰ ، ۷۵ ، ۱۰۰ ، ۱۲۵ و۱۵۰ مگاپاسکال قرار داده و یک نمونه نیز به عنوان شاهد و بدون اعمال فشار نگهداری گردید. کلیه نمونه‌ها پس از ۲٤ ساعت نگهداری در ٤°C از نظر تعداد پرگنه در واحد حجم (CFU) ، فعالیت آنزیمی و تغییرات ریخت شناسی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج پس از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که فشار ۵۰MPa هیچ تأثیری بر مخمر نداشته اما فعالیت آنزیمی مخمر تحت اثر فشارهای ۷۵ و۱۰۰ مگاپاسکال در مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه اعمال فشار به میزان قابل ملاحظه ای افزایش می یابد. با اینحال تصاویر میکرو گراف الکترونی به روش اسکن میکروسکوپ الکترونی (SEM) حاکی از تغییرات شدید سلول تحت اثر فشار ۱۰۰ MPa علیرغم افزایش فعالیت مخمر می باشد. میزان فعالیت آنزیمی مخمر تحت اثر اعمال فشارهای ۱۲۵ و۱۵۰ مگاپاسکال کاهش یافته و تعداد پرگنه در واحد حجم به اندازه حداقل یک چرخه لگاریتمی کاهش نشان می دهد که این اثرات می تواند ناشی از تغییرات شدید ساختمان سلول مخمر تحت اثر اعمال فشارهای ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰مگاپاسکال باشد. هم چنین بررسی ریخت شناسی سلولی مخمر پس از یک ماه نگهداری در ٤°C نشان داد که کلیه نمونه‌های تیمار شده با فشار تجزیه شده و ازبین رفته‌اند.

کلیدواژگان: فشار ایزو استاتیک، فعالیت آنزیمی، ریخت شناسی سلول

۱- مقدمه

استفاده از فرآیند فشار بالا یک امکان بالقوه برای فرآوری و نگهداری موادغذایی به شمار می‌آید. این فرآیند قادر به غیرفعال ساختن میکرواورگانیزمها و آنزیمها بوده و بکارگیری این فناوری در صنایع غذایی نیازمند شناخت سازوکار و سینتیک فشار در تخریب و نابودی و یا غیرفعال کردن میکرواورگانیزمها، آنزیمها و پروتئینها می‌باشد [۱و۲]. اولین گزارشها در مورد تأثیر فشار ایزواستاتیک بر میکروارگانیزمها توسط Cretes در سال

* مسؤول مکاتبات: E-mail: moreza1937@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

۱۸۸۳ منتشر گردید. او باکتریهای زندهای را در عمق ۵۱۰۰ متری دریا مشاهده نمودار [۳] همچنین اثر استفاده از فشار بالا برای نگهداری شیر توسط Hite و همکاران در دانشگاه ویرجینای غربی مورد بررسی قرار گرفت [٤] اصولا سلولهای رویشی مخمرها وکپکها نسبت به فشار حساس هستند و در فشارهای ٦۰۰- ۳۰۰مگاپاسکال غیرفعال می شوند. اما باکتریها نسبت به فشار بسیار مقاوم بوده و غیر فعال نمودن آنها نیازمند اعمال فشارهای بالاتر است. مقاومت باکتریها درمقابل فشار متفاوت است. شکلهای گرد یا کوکسی نسبت به شکلهای، باسیل یا کشیده و نیز باکتریهای گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی مقاومترند. علاوه بر این ثابت شده است کههاگهای باکتریها مقاوم ترین اشکال میکروبی نسبت به فشار به شمار می آیند [۵]. در این بین اعمال فشارهای کمتر از حد کشندگی در میکروارگانیزمها سبب تغییر در فعالیتهای حیاتی و متابولیکی آنها می شود مثلا" اعمال فشارهای ۲۰۰ تا ٤۰۰ مگاپاسکال سبب جوانه زنی اسپور باکتریها و یا اعمال فشارهای۲۰۰-۵۰ مگاپاسکال در مخمرها سبب تغییر در ترشح متابولیتهای آنها می گردند. نتایج برخی از آزمایشها نشان می دهد که اعمال فشار سبب تأخیر در رشد سلولهای مخمر سویه IFo2347 و کاهش تعداد سلول ($۵*۱۰^{٦}$ سلول در میلی لیتر) در فاز لگارتیمی می گردد و فشار بیش از ٤۰ مگا پاسکال تقسیم سلولی را کاملاً متوقف می سازد [٦و۷]. فشار ایزواستاتیک در محدوده ۱۰۰ مگا پاسکال و بالاتر سبب ایجاد جهش در سلولهای مخمر و تولید شکلهای چهارتایی و دوتایی می شود و ساختمان حیاتی سلول را تحت تأثیر قرار می دهد. فشارهای بالاتر از ۱۵۰ مگا پاسکال سبب آسیب به غشاء و ساختار پروتئینی مخمر شده و باعث مرگ سلول می گردد [۸و۹] مشاهده شده است که فشار ایزواستاتیک ٦۰ مگا پاسکال سبب افزایش اسیدی شدن و کاهش pH واکوئل می گردد که به نظر می رسد دلیل این امر تولید دی اکسید کربن و احتمالاً افزایش فعالیتهای آنزیمی و ترشح متابولیتها توسط مخمر باشد [۱۰و۱۱] در سال ۱۹۸۳ Kilbanov ثبات آنزیم اینورتاز حاصل از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* تحت فشارهای بالا را مورد بررسی قرار داد ودریافت که در دامنه۲۵۰ مگاپاسکال آنزیم دارای ثبات نسبی بوده و نیمه عمر[۱] این آنزیم ۱۵ ± ۲۰۰ دقیقه است و برای غیرفعال شدن نیازمند فشارهای بالاترمی باشد [۱۲و۱۳].

هدف از این پژوهش بررسی اثر فشار هیدرواستاتیک درافزایش فعالیتهای حیاتی مخمر از جمله ترشح آنزیم می باشد که نقش مهمی در بهره وری بیشتر از این میکروارگانیسم درصنایع تخمیری و بخصوص صنایع پخت دارد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- خالص سازی و تهیه استوک حاوی سویه موردآزمایش: مخمرنانوایی واریته تجاری

(Saccharomyces cerevisiae) از شرکت ایران ملاس خریداری گردید. تحت شرایط سترون ۱۱ گرم سلول مخمر با ۹۹ میلی لیتر آب سترون مخلوط و تعلیق میکروبی تهیه گردید . تعلیق میکروبی آماده شده در رقتهای ۱۰ تا $۱۰^{-۸}$ سلول در میلی لیتر تهیه گردید.و آن گاه این رقتها بر روی محیط PDA[۲] به روش خطی Trisector کشت داده شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. از پرگنه‌های تکی مجدداً بر روی محیط جدید کشت خطی تهیه شد این عمل ۳ بار به طور متوالی تکرار گردید هدف از این کار اطمینان از تهیه کشت خالص بود. از بشقابهای سوم پرگنه‌های تکی انتخاب شدند و از این پرگنه‌ها بر روی محیطهای شیب دار PDA در تیوپ کشت به عمل آمد پس از گرمخانه گذاری و رشد بر روی این محیطها، لوله‌های آزمایش به عنوان منبع کشت خالص مورد استفاده قرارگرفت به این ترتیب ۸ کشت

۱- Half life زمان مورد نیاز برای کاهش ۵۰٪ فعالیت از مقدار اولیه

2- Potato Dextrose Agar

Archive of SID
www.SID.ir

مخمر در ۳ تکرار تهیه گردید.. از منبع مخمر که قبلا" بر روی محیط شیب دار تهیه شده بودند تحت شرایط سترون سوزن آنس به طور جزئی با پرگنه‌ها آغشته شده و این سوزن وارد محیط YPD[1] در لوله‌ها تلقیح گردید. پس از طی دوره گرمخانه گذاری یک میلی لیتر از آن به ارلن مایرهای حاوی۱۰۰ میلی لیتر YPD تلقیح شد. و مجدداً گرمخانه گذاری گردید(۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت). سلولهای مخمراز محیط کشت توسط دستگاه نیروی گریز از مرکز(۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه) جداسازی و با بافر فسفات ۰/۱ مول (۷ =pH) سه بار شستشو شدند و سپس در مقیاس McFarlane تعلیق مورد نظر آماده شد. از تعلیق به لوله‌های درب دار سترون در حجمهای ۱/۵ میلی لیتر منتقل گردید [۱٤].

۲-۲ فرآیند اعمال فشار

برای تحت فشار قراردادن نمونه‌ها ازپرس ایزواستاتیک مدل Dorst2000 ساخت کارخانه Dorst-Maschinen and An Angen Bov کشورآلمان استفاده گردید نمونه‌های حاوی تعلیق مخمر در حدود ۱۰۸ سلول میلی لیتر به میزان۱ میلی لیتر درون لوله‌های پلی اتیلن با حجم ۱ میلی لیتر به صورت سترون تهیه شده و پس از قرار گرفتن در محیط مایع (آب خالص) تحت فشارایزو استاتیک قرار می گرفتند. اعمال فشار توسط برنامه داده شده به دستگاه در زمان لازم صورت می گرفت و پس از اعمال فشار نمونه‌ها به مدت ۲٤ ساعت دردرجه حرارت٤C° نگهداری و سپس مورد میزان CFU[2]، میزان تولید دی اکسید کربن و فعالیت آنزیمی مورد اندازه گیری قرار گرفتند. میزان فشار ایزواستاتیک در مقادیر ۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ مگاپاسکال به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه اعمال می شد [۱۵].

1. Yeast Potato Dextrose
2. Colony Forming Unit

۲-۳ فعالیت آنزیمی مخمر

۵۰۰ میکرولیتر از تعلیق مخمر (معادل عدد ی مقیاس McFarlane) به ارلن مایرهای حاوی ۵۰ میلی لیتر ساکارز ۰/٤ مولار در شرایط سترون افزوده شد. (جمعیت میکروبی حدود ۱*۱۰[۶]) ارلنها به گرمخانه ۲۵ ± ۱C° منتقل گردید. پس از ٤ ساعت گرمخانه گذاری ارلنها را خارج کرده وپس از هم زدن ارلنها ، برای یکنواخت شدن جمعیت میکروبی ۵ میلی لیتر از محیط مایع حاوی کشت سلول برداشته و به ارلن سترون دیگری منتقل گردید. سپس ۱۵ میلی لیتر محلول DNS[3] به آن اضافه شده و ترکیب حاصل شدیداً هم زده شد. بعد از آن ارلن ۱۵ دقیقه در ظرف حاوی آب جوش قرار گرفت و بلافاصله در مخلوط آب و یخ (۰ درجه سانتی گراد) به مدت ۱۰ دقیقه قرارداده شدو سپس به ارلن ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شده و شدیداً هم زده شد. مقدار ۱ میلی لیتر از محلول برداشته شده و در کووتهای طیف سنج نوری ریخته شده و جذب در ۵۵۰nm توسط طیف سنج نوری (UV-VIS. Shimatzu) قرائت گردید. هم جنین به منظور انجام مقایسه منحنی استاندارد گلوکز نیز تهیه گردید [۱٦]

۲-٤ فرمانتوگرافی

برای اندازه گیری فعالیت مخمر ساکارومایسس سرویزیا از دستگاه فرمانتوگراف SJA,Sweden استفاده گردید. نتایج براساس میلی متر مکعب گاز دی اکسید کربن تولید شده در مجموع دو ساعت فعالیت مخمر در خمیر تهیه شده بوسیله دستگاه فرمانتوگراف گزارش شده است .

۲-۵ مشاهدات میکروسکوپی

به منظور بررسی اثر فشار بر ساختار سلول مخمر آزمایشهای میکروسکوپی توسط میکروسکوپ الکترونی مدل Leo 1450 VP به روش ریخت شناسی انجام

3. Dinitro Salicilic acid

Archive of SID
www.SID.ir

گرفت و نمونه‌های شاهد و تیمار شده با فشار با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و به روش استاندارد SEM[1] مورد مطالعه قرار گرفته و عکسبرداری به عمل آمد.

۲-٦ طرح آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از طرح بلوک کاملاً[2] تصادفی به روش فاکتوریل استفاده گردید و میانگینهای بدست آمده از تجزیه آماری توسط آزمون چند دامنه ای دانکن[3] در سطح P≤ ۰/۰۵ با یکدیگر مقایسه و کمترین حد اختلاف[4] معنا دار برای هرکدام از تیمارها تعیین گردید

۳- نتایج و بحث

۳-۱ تفسیر نتایج

کلیه داده‌های به دست آمده از آزمون فشار در زمانهای مختلف بر سلولهای مخمر ساکارومایسس سرویزیا در صفات مورد مشاهده یعنی تعداد کلنی در واحد (C.F.U)، میزان تولید دی اکسید کربن و فعالیتهای آنزیمی مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفت که در جدول (۱) میانگین مربعات و درجه آزادی هر یک از تیمارها و اثرات متقابل آنها آورده شده است.

جدول۱ میانگین مربعات تیمارها و اثرات متقابل آن

مشاهدات / تیمارها	درجه آزادی	تعدادپرگنه در واحد	دی اکسید کربن	فعالیت آنزیمی
سطوح تکرار	۲	۰/۰۹۷ ns	۱٦/٦۷ ns	۱۲/۰۲۱ ns
سطوح میزان اعمال فشار	۵	۳/۹۰٤**	٤۲٦/٦٦۷**	۲۰۷/۰۲۷**
سطوح زمان اعمال فشار	۲	۰/۰۱۹ ns	۵۹/۷۲۲ ns	۱/۰۹۳ ns
اثر مقابل فشار در زمان	۱۰	۰/٦۰۲**	۸٦/۳۸۹**	۳٤۰/۱۰**
میزان خطا	۳٤	۱۱۷	۸/۳۳۳	۲٦/۷۳۳

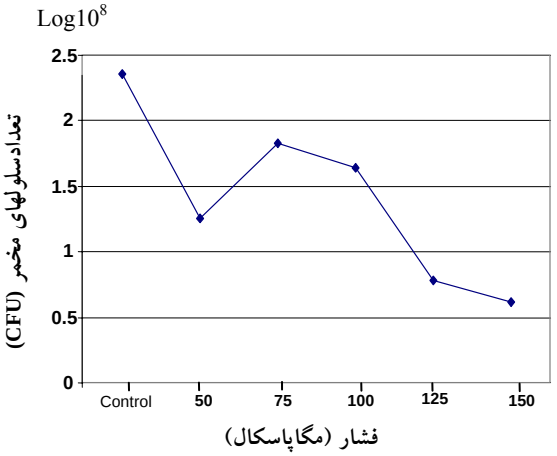
ns: فاقد اختلاف معنا دار آماری **: دارای اختلاف کاملا" معنا دار آماری در سطح P≤۰/۰۱ *: دارای اختلاف معنا دار آماری در سطح P≤ ۰/۰۵

به طوری که در جدول (۱) مشاهده می شود مقادیر به دست آمده در سطوح تکرارها و نیز سطوح زمان اعمال فشار در هیچکدام از صفات مورد مشاهده اختلاف معنا دار آماری مشاهده نمی گردد. اما میزان اعمال فشار و اثر متقابل میزان فشار در زمانهای یاد شده دارای اثرات کاملاً معنا دار آماری می باشنددر بررسی و مقایسه میانگینهای به دست آمده در صفات میزان اعمال فشار دوره اعمال فشار و اثرات متقابل آنها توسط آزمون چنددامنه ای دانکن همان طور که در شکل (۱) مشاهده می شود با افزایش میزان فشار تعداد سلولهای زنده کاهش یافته است هرچند این کاهش تا فشار ۱۰۰ مگاپاسکال کمتر از یک چرخه لگاریتمی است اما در مقادیر فشار ۱۲۵ تا ۱۵۰ مگاپاسکال باندازه یک سیکل لگاریتمی کاهش مشاهده می‌شود [۱۷] تأثیر فشار بر فعالیت حیاتی سلولهای مخمر توسط محققانی چونPandya و همکاران نیز بررسی گردیده است. آنها نشان دادند که فشارهای کمتر از ٦۰ مگاپاسکال تأثیر چندانی بر فعالیت حیاتی مخمر ندارد [۱۸]. کاهش تعداد سلولها در فشار ۵۰ مگا پاسکال به دلیل ایجاد شوک فشار نظیر شوک حرارتی است که بر سلولهای مخمر حساس

1- Scanning Electron Microscopy
2- Randomized Complete Block Design (RCBD)
3- Duncan Multiple Range Test
4- Least Significant Differences (LSD)

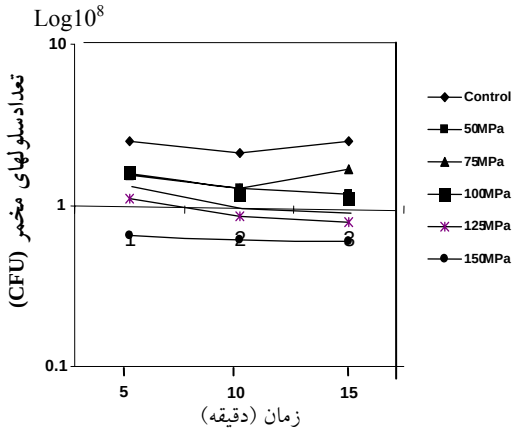
Archive of SID
www.SID.ir

به فشار مؤثر بوده و سبب کاهش فعالیت حیاتی آنها شده است. بطوریکه در محدوده فشارهای ٤٠ مگا پاسکال در فاز لگاریتمی تقسیم سلولی به طور کامل متوقف شده است. علاوه بر این مخمرها به دلیل بزرگی قطر سلول نسبت به باکتریها به فشار، حساس ترند بطوریکه اعمال فشارهای بیش از ۱۵۰ مگا پاسکال سبب مرگ کامل سلول مخمر می شود Rosin & Zimmerman مشاهده کردند که اعمال فشار هیدرواستاتیک از بالاتر از ۱۰۰ مگاپاسکال سبب تخریب ساختمانهای حیاتی سلول Saccharomyces cerevisiae می‌گردد و فشارهای بالاتر از ۱۵۰ مگاپاسکال باعث آسیب به غشاء و ساختار پروتئینهای مخمر و بالاخره مرگ سلول می گردد [۱۹]. Knorr و همکاران کاهش تعداد سلولهای مخمر ساکارومایسس را از مقادیر ۱۰۰MPa فشار به بالا نشان دادند [۲۰].



شکل۱ اثر فشار ایزواستاتیک بر تعداد سلولهای مخمر

با افزایش زمان و میزان فشار تعداد سلولهای مخمر دچار کاهش قابل ملاحظه ای شدند. در ۵ دقیقه اعمال فشار ۱۲۵ مگا پاسکال کاهش تعداد سلول مشاهده می شود اما نه به اندازه یک چرخه لگاریتمی اما با افزایش زمان اعمال فشار به ۱۰ و ۱۵ دقیقه این کاهش به اندازهیک چرخه لگاریتمی بوده است (شکل ۲).

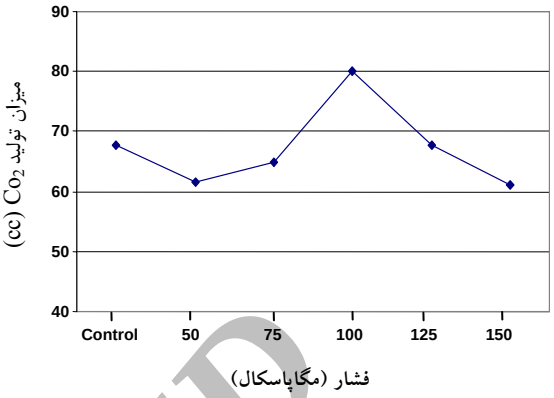


شکل۲ اثرمتقابل میزان و زمان اعمال فشار بر رشد سلولهای مخمر

Gould و همکاران یکی از موارد عمده مرگ میکروارگانیزمها را نگهداشتن آنها تحت فشار بر شمردند (۲۱و۲۲). غیرفعال شدن سلولهای مخمر با افزایش زمان اعمال فشار نیز توسط سایر محققان ثابت شده است و به مانند فرآیندهای معمول حرارتی با افزایش زمان اعمال فشار مقاومت بسیاری از میکروارگانیزمها درمقابل فشار کاهش یافته و غیرفعال می شوند [۲۳و۲٤]. شدت اعمال فشار عامل بسیار موثر در کاهش تعداد سلولها در هنگام نگهداری سلولهای میکروبها تحت فشار می باشد. بعضی از محققین معتقدند که سلولهای مخمر در فشارهای پایین (کمتر از ٦۰ مگاپاسکال) حتی به مدت یک ساعت کاهش قابل ملاحظه ای ندارند اما با افزایش فشار در زمانهای ۵ دقیقه و کمتر (۱۵۰ مگا پاسکال به بالا) غیر فعال می گردند در صورت اعمال فشار ۲۵۰ مگا پاسکال بیشتر از ۹۰ درصد سلولهای مخمر غیرفعال شدند [۲۵]. اعمال فشارهای ۵۰ و ۷۵ مگا پاسکال هیچگونه تأثیری بر تولید دی اکسید کربن توسط مخمر نداشته اند اما در فشار ۱۰۰ مگا پاسکال فعالیت متابولیکی و در نتیجه میزان تولید دی اکسید کربن آن افزایش یافته است و این مسأله می تواند به علت واکنش قابل ملاحظه ای مخمر به صورت تشدید فعالیت متابولیکی و آزاد ساختن آنزیم در این میزان فشار باشد. در شکل(۳) مشاهده می شود تعداد سلولهای مخمر کاهش یافته اما فعالیت مخمر دردامنه این فشار افزایش

Archive of SID
www.SID.ir

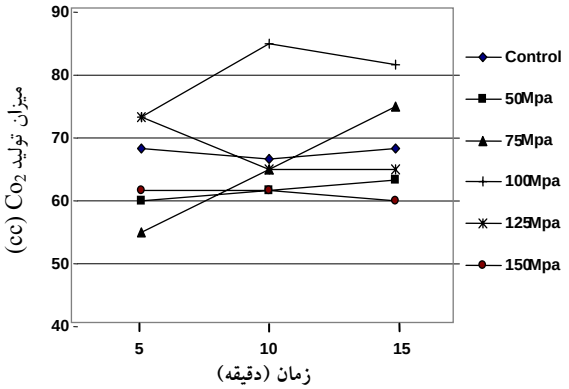
یافته است.



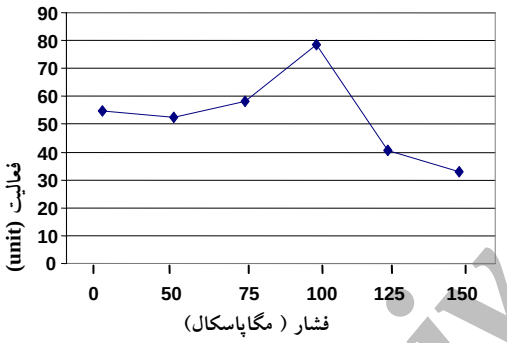
شکل۳ اثر میزان فشار بر تولید دی اکسید کربن مخمر

افزایش قابل ملاحظه ای در تولید دی اکسید کربن و MPa ۱۰۰ در مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه اعمال فشار به وجود آمده و بطور کلی بالاترین میزان دی اکسید کربن در فشار MPa ۱۰۰ بوده است و زمان اعمال فشار بین ۵ تا ۱۵ دقیقه با یکدیگر فاقد اختلاف معنا دار آماری هستند اما اعمال فشار در ۱۵ دقیقه سبب کاهش تولید دی اکسید کربن توسط مخمر شده است و فشارهای کمتر از MPa ۱۰۰ اثر قابل ملاحظه ای در فعالیت متابولیسمی مخمر و تولید دی اکسید کربن نداشته است. هم چنین بر اثر اعمال فشار بالاتر از ۱۰۰ مگا پاسکال به میزان ۱۲۵ و ۱۵۰ مگا پاسکال میزان تولید دی اکسید کربن توسط مخمر به مقدار قابل ملاحظه ای کاهش نشان می دهد اما هیچگونه اثر معنا داری بین زمانهای اعمال فشار ۱۲۵ و ۱۵۰ مگا پاسکال مشاهده نمی شود (شکل ٤).

میزان فعالیت آنزیمی در فشارهای ۵۰ و ۷۵ مگا پاسکال برابر فعالیت آنزیمی نمونه‌های شاهد می باشد اما در صورت اعمال فشار MPa ۱۰۰ فعالیت آنزیمی افزایش یافته در فشارهای بالاتر یعنی MPa ۱۲۵ و ۱۵۰ مجدداً کاهش نشان می دهد بطوریکه فعالیت آنزیمی در MPa ۱۵۰ به حداقل مقدار نسبت به شاهد می رسد (شکل ۵).



شکل٤ اثر میزان و زمان اعمال فشار بر تولید دی اکسید کربن توسط مخمر



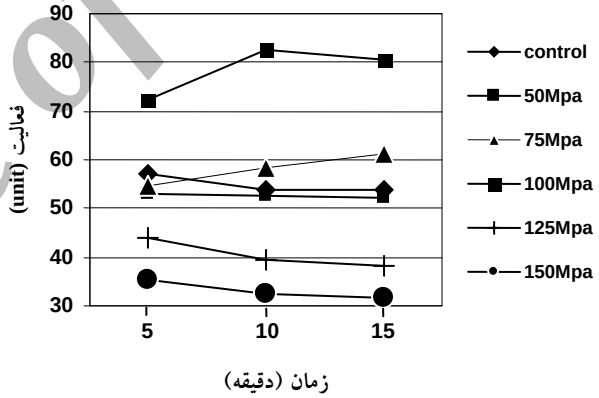
شکل۵ اثر میزان فشار بر فعالیت آنزیمی مخمر *S.cerevisiae*

اعمال فشار در مقادیر مختلف و زمانهای ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه بر فعالیت آنزیمی مخمر نشان می دهد که بالاترین فعالیت آنزیمی مربوط به اعمال فشار MPa ۱۰۰ در ۱۰ و ۱۵ دقیقه فشار می باشد و فشارهای بالاتر از این مقدار در زمانهای یاد شده کاهش قابل ملاحظه ای بر فعالیت آنزیمی مخمر دارد. فشارهای ٦۰- ٤۰مگا پاسکال سبب کاهش pH واکوئل در حدود ۰/۳۳ واحد می شود و این کاهش pH در حضور گلوکز صورت می پذیرد. pH سیتوپلاسم سلول نیزتمایل به کاهش نشان می دهد که نقش مهمی در فعالیت حیاتی سلول خواهد داشت. اسیدی شدن سیتوپلاسم در دامنه کمتر از MPa ۱۰۰ ادامه می یابد که ظاهراً سبب

Archive of SID

www.SID.ir

واکنش و تحریک ترشحات متابولیکی مخمر مـی گـردد . در شکل (٦) مشاهده می شـود اعمـال فـشار ایزواسـتاتیک تـا مقادیر کمتر از ۷۵ پاسکال اثر چنـدانی بـر فعالیـت آنزیمـی ندارد. اما با افزایش شـدت و نیـز زمـان اعمـال فـشار از ۷۵ مگاپاسکال تا MPa ۱۰۰ فعالیت آنزیمی افزایش می یابـد و مجدداً در فشار MPa۱۲۵ و ۱۵۰ کاهش نشان می دهد. آمار و ارقام به دست آمده نشان می دهد که فشار ایزواستاتیک در تنظیم فعالیت و ثبات برخی از آنزیمها نقـش دارد فـشار مـی تواندعملکرد هیدرولیتیکی آنزیمها را از طریـق تغییـر مـسیر تنظیم سرعت و یـا از طریـق تنظـیم قابلیـت انتخـابی آنـزیم اصلاح نماید. افزایش ثبـات آنزیمهـا در برابـر دناتوراسـیون ناشی از اعمال فشار اهمیت زیادی در فعالیتهـای بیولـوژیکی جهت تغییر و تبدیل آنزیمی در فشار بالا دارد [۲٦].



شکل ٦ اثر زمان وفشار بر فعالیت آنزیمی *S. cerevisiae*

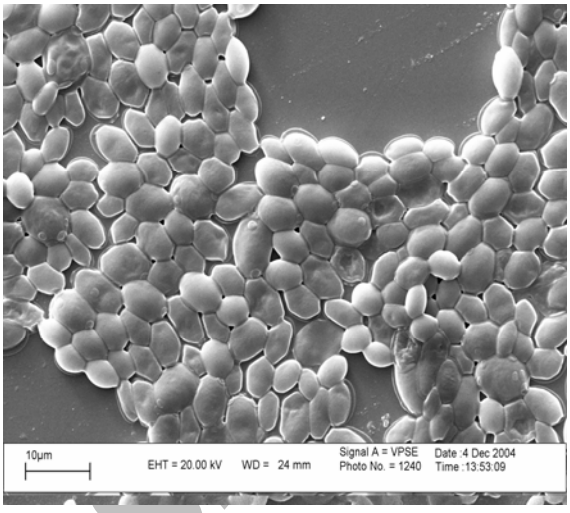
اعمال فشار در مقـادیر مختلـف و زمانهـای ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه بر فعالیت آنزیمی مخمر نشان می دهـد کـه بـالاترین فعالیت آنزیمی مربوط به اعمـال فـشار MPa ۱۰۰ در ۱۰ و ۱۵ دقیقه فشار می باشد و فشارهای بالاتر از ایـن مقـدار در زمانهای یاد شده کاهش قابل ملاحظه ای بر فعالیت آنزیمـی مخمر دارد. فشارهای ٦۰- ٤۰مگا پاسکال سبب کـاهش pH واکوئل در حدود ۰/۳۳ واحد می شود و این کـاهش pH در حضور گلوکز صورت مـی پـذیرد. pH سیتوپلاسـم سـلول نیزتمایل به کاهش نشان می دهد که نقش مهمی در فعالیـت حیاتی سلول خواهد داشـت. اسـیدی شـدن سیتوپلاسـم در دامنه کمتر از MPa ۱۰۰ ادامـه مـی یابـد کـه ظـاهراً سـبب واکنش و تحریک ترشحات متابولیکی مخمر مـی گـردد . در شکل (٦) مشاهده می شـود اعمـال فـشار ایزواسـتاتیک تـا مقادیر کمتر از ۷۵ پاسکال اثر چنـدانی بـر فعالیـت آنزیمـی ندارد. اما با افزایش شـدت و نیـز زمـان اعمـال فـشار از ۷۵ مگاپاسکال تا MPa ۱۰۰ فعالیت آنزیمی افزایش می یابـد و مجدداً در فشار MPa۱۲۵ و ۱۵۰ کاهش نشان می دهد. آمار و ارقام به دست آمده نشان می دهد که فشار ایزواستاتیک در تنظیم فعالیت و ثبات برخی از آنزیمها نقـش دارد فـشار مـی تواندعملکرد هیدرولیتیکی آنزیمها را از طریـق تغییـر مـسیر تنظیم سرعت و یـا از طریـق تنظـیم قابلیـت انتخـابی آنـزیم اصلاح نماید. افزایش ثبـات آنزیمهـا در برابـر دناتوراسـیون ناشی از اعمال فشار اهمیت زیادی در فعالیتهـای بیولـوژیکی جهت تغییر و تبدیل آنزیمی در فشار بالا دارد [۲٦].

۳-۲ مشاهدات با میکروسکوپ الکترونی

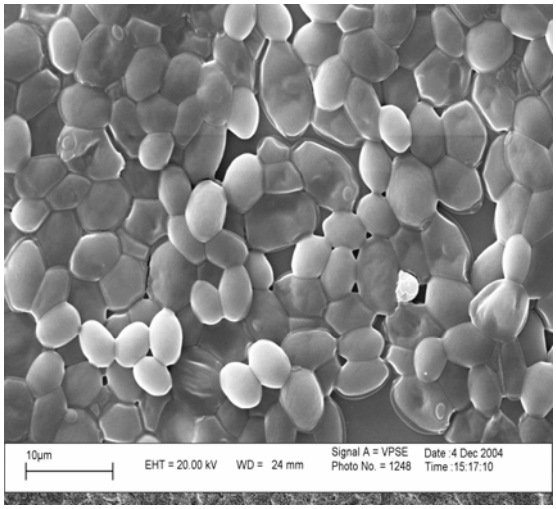
بررسی اثر فشار ایزواسـتاتیک بـالا بـر سـاختمان و ریخـت شناسی سلول مخمرتوسط میکروسکوپ الکترونی نشان مـی دهد که به تدریج با افزایش فشار طول سلول مخمر افـزایش می یابد ودر مقایسه بـا سـلولهای شـاهد ایـن تغییرریخـت شناسی کاملاً مشهود است. شکل (۷) تصویر سلولهای مخمر را در حالتی که هیچگونه فشاری بـر آنهـا وارد نـشده اسـت نشان می دهد. بطوریکه ملاحظه مـی گـردد از نظـر ریخـت شناسی سطح سـلولها صـاف و تخـم مرغـی شـکل بـوده و هیچگونه آثار ناشی از اثر عوامل خارجی بر سـلول مـشاهده نمی گردد. مطابق شکل (۸) فشار ۵۰ مگا پاسکال در مـدت ۱۵ دقیقه توانسته است اندکی تغییرات در بعضی از سلولهای مخمـر ایجـاد نمایـد. ایـن تغییـرات شـامل افـزایش طـولی ودربعضی بزرگ شدگی سلول می باشد که ایـن تفـاوتی کـه در عکس العمل سلولها نسبت به فشارکه در این دامنه ظـاهر می‌شود احتمالاً بـه دلیـل اخـتلاف در زمـان تقـسیم سـلولی می‌باشد شکل۸ تصویر میکروگراف الکترونـی را ۲٤ سـاعت پـس از اعمـال فـشارMPa ۵۰ ونگهـداری در°C ٤ نـشان

Archive of SID
www.SID.ir

می‌دهد. هم چنین یک نوع تجمع سلولها ناشی از تنش ایجاد شده بر اثر فشار دیده می شود.در بعضی از سلولها ی تیمار شده در فشار ۷۵ مگا پاسکال تغییرات سطحی در دیواره سلول مخمر کاملا قابل مشاهده است.

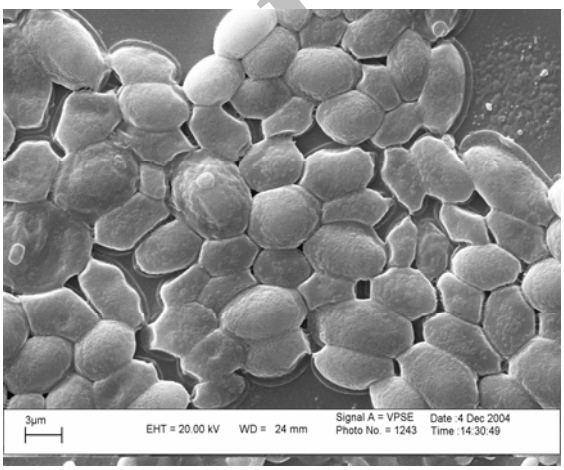


شکل۷ سلولهای مخمر.S.cerevisiae سالم و بدون اعمال فشار(شاهد)



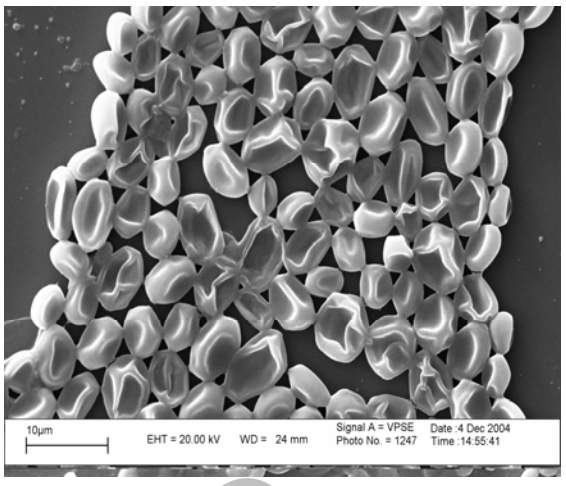
شکل ۸ سلولهای مخمر.S.cerevisiae تحت فشار۵۰ MPa

به علاوه همانطور که در شکل (۹) مشاهده می شود تجمع سلولی بیشتر شده است به طوری که کناره‌های دیواره سلولی مخمر فرو رفتگیهائی با اشکال منظم ویا نامنظم هندسی به خود گرفته‌اند. که درتصویر میکروگراف الکترونی ۲٤ ساعت پس از اعمال فشار ۷۵MPa قابل مشاهده است. شکل(۱۰) تصویر میکروگراف الکترونی را براثر اعمال فشار در ۱۰۰MPa نشان می دهد در فشار ۱۰۰ مگاپاسکال دیواره سلولی در برابر فشار نتوانسته است مقاومت کند و به طرف داخل فرو رفتگی عمیقی ایجاد شده است و به نظر می رسد که به علت تشدید فعالیت متابولیکی مخمر براثر واکنش شدید سلولها در مقابل این دامنه فشار می باشد. می توان گفت که تقریباً کلیه سلولها تحت تأثیر فشار۱۰۰ مگا پاسکال دچار تنش شدید شده اند. ایجاد تغییرات در فشارهای ۱۲۵ و ۱۵۰ مگا پاسکال به قدری شدید شده‌اند که منجر به غیر فعال شدن و نابودی کامل سلولهای مخمر شده است، و کاهش فعالیت متابولیکی آن شاید به دلیل غیرفعال شدن اکثرفعالیتهای حیاتی سلول مخمر باشدو به نظر می رسد شکلهای (۱۱ و۱۲) تصاویر میکروگراف الکترونی را اعمال فشارMPa ۱۵۰و۱۲۵ نشان می دهد . در فشارهای ۱۲۵ و ۱۵۰ محتویات سلولی مخمر دچار تغییرات شده و به خارج از سلول سرازیر می شوند که نتیجه آن کاهش فعالیت متابولیسمی وبالاخره نابودی مخمر می باشد . این نتایج توسط دیگر محققین نیز تآیید شده اند(۲۷)

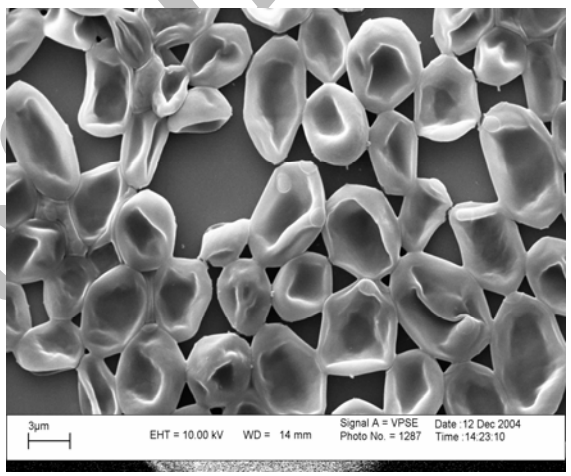


شکل ۹ سلولهای مخمر.*S.cerevisiae* درMPa ۷۵ فشار

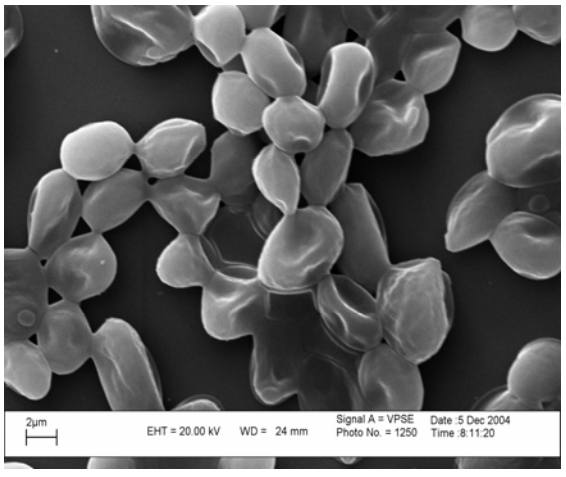
www.SID.ir



شکل۱۰ سلولهای مخمر *S.cerevisiae* در MPa ۱۰۰ فشار



شکل ۱۱ سلولهای مخمر *S.cerevisiae* در فشار MPa ۱۲۵

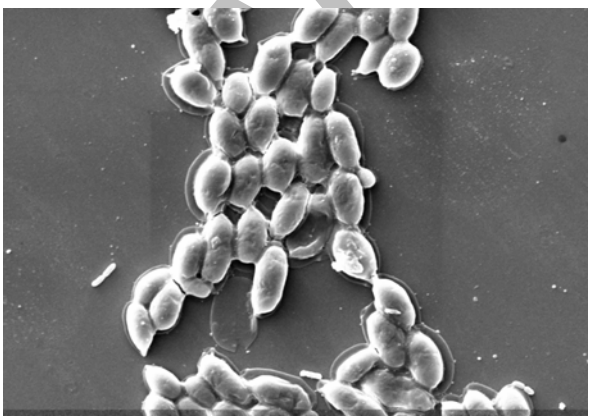


شکل۱۲ سلولهای مخمر *S.cerevisiae* در فشار MPa ۱۵۰

بررسی اثرات فشار برسلول مخمر پس از یک ماه نگهداری در $4C^{\circ}$ توسط میکروسکوپ الکترونی: مشاهدات میکروسکوپی با میکروسکوپ الکترونی پس از یک ماه نگهداری در حرارت یخچال نشان می دهد که سلولهای مخمر در فشارهای ۵۰و ۷۵ مگا پاسکال نسبت به شاهد چندان تغییری نمی کنند (اشکال ۱۳، ۱٤) اما کلیه سلولهای مخمر تیمار شده درفشارهای MPa ۱۰۰ و۱۲۵MPa به بالاپس از یک ماه به طور کلی نابود شده و از بین می روند (اشکال ۱۵و۱٦) این نتایج از دو جنبه دارای اهمیتند.

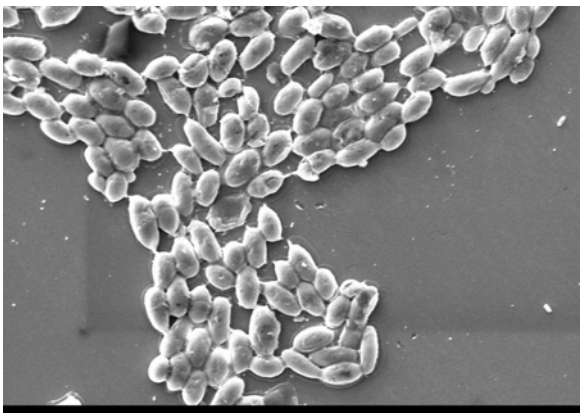
الف : اعمال فشارهای بیش از MPa ۱۰۰نه تنها مفید نیستند بلکه سبب نابودی کامل مخمرها در دراز مدت می گرددکه نتیجه آن تغییرات مضر وشدید درون سلولی می باشد و فشارهای کمتر از این مقدار تآثیر چندان مضری ندارند [۲۸].

ب: با استناد به این نتایج و تخقیقات تکمیلی می توان امیدوار بود که با استفاده از فشارهای نه چندان بالا و دردامنه ۱۲۵ و MPa۱۵۰ که هیچگونه تغییرمحسوسی در کیفیت مواد غذائی ندارند و به علاوه هزینه چندان گرانی را در بر ندارند و می توان سلولهای مخمر را درفرآورده‌هائی نظیر آب میوه که مضر شناخته می شوند غیر فعال نمود [۲۸و۲۹].

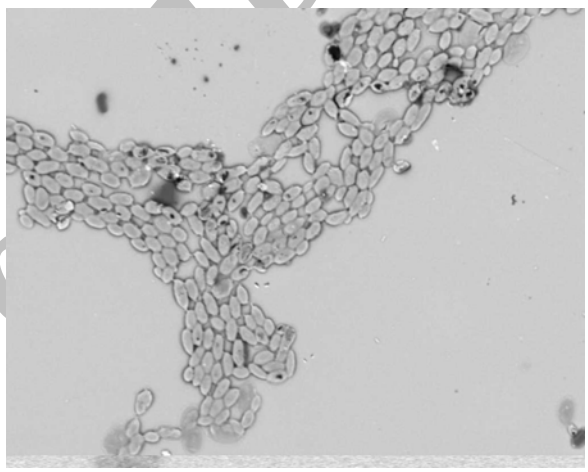


شکل۱۳ تصویر از مخمر شاهد پس از یکماه نگهداری در $4°C$

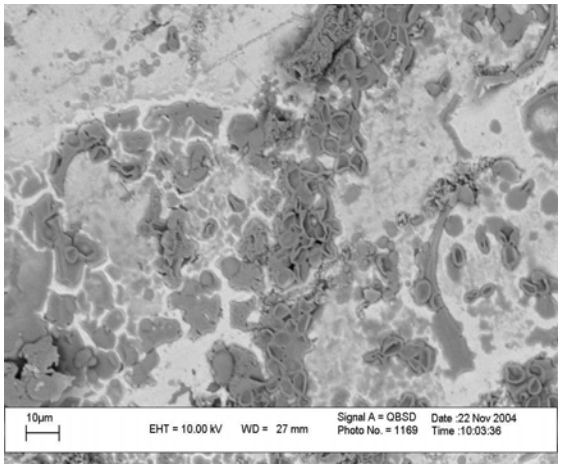
www.SID.ir



شکل ١٤ تصویر مخمر تحت فشار MPa ٧٥پس از یکماه نگهداری در ٤°C



شکل١٥ تصویر سلولهای مخمر تحت فشار MPa ١٠٠ پس از یکماه نگهداری در ٤°C



شکل١٦ تصویر سلولهای مخمر *S.cerevisiae* براثر اعمال فشار MPa ١٢٥ پس از یک ماه نگهداری دردمای ٤°C

بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که اعمال فشارهای پائین و متوسط (کمتر از ١٠٠ مگاپاسکال) بیشتر سبب تحریک سلولهای مخمر شده و بر اثر تحریک واکنشهای متابولیکی، تقسیم سلولی و ساختار فیزیولوژیک سلول دچار تغییراتی می گردد که از جمله اسیدی شدن سیتوپلاسم و واکوئل، اختلال ویا تحریک تقسیم سلولی، ایجاد جهش و بالاخره تحریک ترشح بیشترمتابولیتها و در نتیجه تشدید فعالیت آنزیمی مخمر ساکارومایسس می گردد. این تغییرات در حضور بعضی از افزودنیها نظیر قندها، پلی اولها و یا ترکیبات غنی کنند. یا بازدارنده به صورت متفاوتی اتفاق می افتد(٢٨و٢٩). مثلا" حضور قندها اثر محافظت کنندگی روی پایداری آنزیمها دارد از طرف دیگر فشارهای ٥٠ مگا پاسکال و کمتر تأثیر چندانی روی این قبیل واکنشها ندارند لذا می توان امیدوار بود که با اعمال فشار و تحریک سلولهای مخمر در محیطهای مختلف سبب ایجاد جهش و افزایش فعالیت آنزیمی شده که استفاده از سویه‌های تیمار شده و یا جهش یافته در افزایش راندمان تولید فرآورده‌های تخمیری و نانوائی نقش به سزائی خواهند داشت. البته انجام تحقیقات بیشتر به خصوص در مدلهای واقعی غذائی و بررسی فعالیت آنزیمی در حضور مواد افزودنی برای اطمینان از حصول نتایج لازم است.

٤- نتیجه‌گیری کلی

استفاده از فناوریهای نوین از جمله اعمال فشارهای بالا سبب تحولات اساسی در بعضی از فرآیندهای مواد غذائی از جمله سالم سازی غیرحرارتی، بهبود ویژگیهای کیفی، بافتی و ارزش تغذیه ای موادغذائی می گردد. از طرف دیگر، فشارهای پائین و متوسط قادر ند موجب تحریک بعضی از میکروارگانیزمها شده و در آنها ایجاد تنش نموده که در نتیجه فعالیتهای متابولیکی را افزایش دهند. سلولهای مخمر ساکارومایسس که دارای ارزش تجاری بسیار زیادی در تولید فرآورده‌های تخمیری و صنایع پخت هستند تحت اثر اعمال فشارهای ٥٠ و ٧٥ مگاپاسکال بدون تغییر می مانند اما فشار ١٠٠ مگاپاسکال تنش زیادی در این سلولها ایجاد

Archive of SID
www.SID.ir

کرده و آنها را وادار به ترشح بیشتر آنزیم نموده که افزایش فعالیت نسبی مخمر را در مقایسه با سلولهای شاهد نشان می دهد. اما افزایش فشار در مقادیر ۱۲۵ و ۱۵۰ مگا پاسکال مجدداً سبب کاهش فعالیتهای حیاتی مخمر شده وعلاوه بر کاهش فعالیت آنزیم تغییرات ساختمانی از جمله فرورفتگیهای دیواره سلول و حتی در بعضی موارد پارگی دیواره و غشاء سلولی رابه دنبال داشته است. همچنین با افزایش زمان نگهداری تغییر چندانی در سلولهای تحت فشار قرار گرفته در فشارهای کمترMPa ۱۰۰مشاهده نشد. اما فشارهای بالا تر از این مقدار سبب نابودی کامل آنها می گردد. با بررسی کلی نتایج طرح می توان امیدوار بود که با اعمال فشار دردامنه بین ۵۰ تا ۱۰۰ مگاپاسکال بتوان فعالیت آنزیمی مخمر و در نتیجه بهره وری آن را در مقیاس تجاری افزایش داد. معذالک مسائلی از قبیل برگشت فعالیت به حالت اولیه بر اثر گذشت زمان و نیز تغییرات درونی سلولی مخمر که منجر به نابودی آنها می شودجزو تحقیقاتی است که در آینده بایستی صورت گیرند.

۵- سپاسگزاری

بدینوسیله از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشکده کشاورزی و دانشگاه فردوسی مشهد به واسطه همکاریهای علمی؛ فنی و مالی وگروه مواد و سرامیک پارک علم و فناوری خراسان به دلیل در اختیار قراردادن پرس ایزواستاتیک برای انجام آزمایشها، جناب آقای دکتر صیرفی مدیریت محترم ایران ملاس و همکاران ایشان به ویژه سرکار خانم مهندس رضائی نژاد، بخاطر انجام آزمایشهای فرمانتوگرافی و به ویژه سرکار خانم صادقی کارشناس محترم آزمایشگاه مرکزی دانشکده علوم برای عکسبرداری الکترونی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

٦- منابع

[1] Mochaer. V. V., Heremans, K., Frak, J., Masson. P., and Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. Prot. Struct. Funet Genet. 24 : 91-99

[2] Popper, I. And Knorr, D. (1990). Application of high- pressure homogenization for food preservation. Food Technology. 44:84-89

[3] Cretes, J.C. (1884). De laction des pressions sur les phenomenens dela sur lavitalite des microorganisms de eau donce etd`eu demer. Competes Ren.dus 99,385-388

[4] Hite, B. H. (1899). The effects of pressure in the preservation of milk. Morgantown. Bull WV Univ Agric Exp Sta Morgantown. 58. 15-35

[5] Rosin, M. P. and Zimmerman, AM. (1997). The induction of cytoplasmic petite mutants of *S. cerevisiae* by hydrostatic pressure. J. cell Sci. 210:373-386.

[6] Abe, F. and Horikoshi, K. (1995). Vacuolar acidification in *S.cerevisiae* induced by elevated hydrostatic pressure. FEMS. Lett. 130:307-312.

[7] Violaine, A. and Didier combs. (1998). Influence of a additives on high pressure stability B galactosidase from K. Lactic and invertase from *S. cerevisiae*. Enzyme & Microbial. Tech. 22-532-537.

[8] Ludikuyze, L., Van Loey, A., Indrawati, Denys, S., and Hendricks. M. (2002) Stabilized of enzymes against thermal inactivation. Trends in High Pressure Biotechnology. 517-524.

[9] Kakinuma, Y. Ohsumi, Y, Anraky, Y. (1981). Properties of H+ - Translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of S.cerevisiae. J. Biolog. Chem. 256: 10859-10863.

Archive of SID
www.SID.ir

[10] Okamoto, M., Hayashi, R., Enomotom, A.Kaminogawa, S., and Yamauchi, K. (1991). High pressure proteolytic digestion of food proteins: Selective elimination of β-lacto globulin in bovine milk whey concentrate. Agric. Biological Chemistry . 55. 1253-1257.

[11] Weber, G. and Drickamber, H. G. (1983). The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. Quart. Rev. Biophysics. 16,89-112.

[12] Mozhaev, V.V. Lange, R.Kudryashova, E. V. Balny.C. (1996). Application of High hydrostatic pressure for increasing activity and stability of enzymes. Biotech Bioeng. 52: 320-331.

[13] Kilbanov, A.M. (1983). Properiesof H+ translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *S.cerevisiae*. Adv. Appl. Microbiol. 29,1-28.

[14] Murakami, T. H and Zimmerman. A. M. (1973). DNA synthesis in Tetrahydranal a pressure study. Cytobios. 7, 171-181.

[15] Schmidt, G., Ludemann, H. D. and Jaenicke,R . (1975). High pressure effects on the activity O glycolytic enzymes. Biophysics. Chem.3, 90-98

[16] Nam San wang. (2004). Enzyme kinetics of invertase dept of chemical eng. Univ Maryland. College. Park MD 9111-ENCH485.

[17] Takeo, K., Yamamura, M., Kamihara, T., (1989). Ultra structural alterations in Saccharomyces cerevisiae cells in association with elevated temperature-induced autolysis. FEMS Microbiol. Lettt. 61, 297–300.

[18] Pandya, Y., Jewett. F, and Hoover, D. G. (1995). Concurrent effects of high hydrostatic pressure, acidity and heat on the destruction and injury of yeasts J. of Food protection. Vol. 58, No. 3:301-304

[19] Rosin, M. P. and Zimmerman, AM. (1997). The induction of cytoplasmic petite mutants of S. cerevisiae by hydrostatic pressure. J. cell Sci. 210:373-386.

[20] Knorr, D, Popper, I, (1991). Application of high-pressure for food preservation. Food Technology. 45:65-71.

[21] Gould. w. (1996). New methods of food preservation. 324 pp. Blacki pub.

[۲۲] مرتضوی، س.ع. معتمدزادگان، ع، ضیاء الحق م .س. ح . ۱۳۸۱. روشهای غیرحرارتی نگهداری مواد غذائی. صفحه ۲۷-۸۱ . انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد

[23] Robinson, J. P. (2004). Flowcytometry & confocal microscopy: similar measurement systems but different solution Purdue .Univ. http//www. Cytoprodue.edn.

[24] Jaenicke, R. (1991). Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions, Eur. J. Biochem. 202:715-728.

[25] Adegoke, G.O.Iwahashi, H., Komatso, (1997). Inhibition of S.cerevisiae by combination of hydrostatic pressure and monotrepens. J. food Sci.vol 62. (2) 404-405.

[26] Iwahashi, H., Obuchi, K., Fuji, S. and Komatsu, Y. (1997). Effect of temperature on the role of Hsp104 and trehalose in bar tolerance of *S. cerevisiae*. FEMS. Lette. 416:1-5.

Archive of SID
www.SID.ir

[27] Ulrich's. Losche, A. Muller, S. (2003). Flowcytometric UFZ center for environmental Research. Leipzig- HA..

[28] Ogawa, H., Fukuhisa, K., Kubo, Y. and Fuckumoto, H. (1990). Pressure inactivation of yeast, Molds and pectinestrease in Satsuma mandarin juice: Effects of juice concentration, pH and organic acids, and comparison with heat sanitation. Agric. Biol. Chem. 54, 1219-1225.

[29] Papineau, A. m. Hoover. D. G and Furkus, D. F. (1991). Antimicrobial effect of water soluble chitosan with hydrostatic pressure. Food Biotech. 5.45- 47.

Archive of SID

www.SID.ir

Activities and morphology of saccharomyces cerevisiae

Seyyed Ali Mortazavi[1*], Abdol Majid Maskooki[2], Amir Ghandi[3], Arash Koocheki[3], Javad Barooei[3]

1- Professor Department of Food Sciences and Technology, Mashhad Ferdowsi University
2- Instructor, Sciences and Khorasan Technology Park
3- M.Sc. Department of Food Sciences and Technology, Mashhad Ferdowsi University

Application of high isostatic pressure in biological and food researches has been extensively studied in the last decade. It has recently been proposed that high isostatic pressure might be applied to increasing both the activity and stability of several enzymes. In this research the enzymatic activity, CFU and morphological changes of commercial S.cerevisia under 0, 50, 75, 100, 125 and 150 MPa pressure at 5, 10, 15 minutes pressurization after 24 hours keeping in 4C° were studied. The results statistically analyzed and showed that 50 MPa pressure didn't affected on yeast cells but increased the enzymatic activity in 75 and 100MPa pressure at 10 and15 minutes pressurization. In addition the images of scanning electron microscope (SEM) showed that despite of increasing activity of enzyme the structure of yeast cell walls changed and hollowed in 100MPa pressure. The enzymatic activity and CFU (1log.) significantly decreased in 125 and 150 MPa. Inactivation of yeasts and decreasing the enzymatic activity can be due to morphological changes of yeast cells by induced high pressure. The images of scanning electron microscope (SEM) after one month pressurization and keeping in 4C° showed that all of treated yeast cells were destroyed.

Keywords: S.cerevisia, high isostatic pressure, enzymatic activity,

Archive of SID

* Corresponding author E-mail: morteza1937@yahoo.com

www.SID.ir