

اثر فشار ایزو استاتیک بالا بر فعالیتهای متابولیکی و ریخت شناسی مخمر

Saccharomyces cerevisiae

سید علی مرتضوی^{۱*}، عبدالمجید مسکوکی^۲، امیر قندی^۳، آرش کوچکی^۳، جواد باروئی^۳

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

۲- مربی، علمی پارک علم و فناوری خراسان

۳- دانش آموخته 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 غذایی 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 تجارتي مخمر *Saccharomyces cerevisiae* را به مدت ۰.۵ و ۱۰.۵ دقیقه تحت فشارهای ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ مگاپاسکال قرار داده و یک نمونه نیز به عنوان شاهد و بدون اعمال فشار نگهداری گردید. کلیه نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت نگهداری در ۴°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 ۵۰ MPa هیچ تأثیری بر مخمر نداشته اما فعالیت آنزیمی مخمر تحت اثر فشارهای ۷۵ و ۱۰۰ 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 و ۱۵۰ 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 ۱۵۰ مگاپاسکال باشد. هم چنین بررسی ریخت شناسی سلولی مخمر پس از یک ماه نگهداری در ۴°C نشان داد که کلیه نمونه‌های تیمار شده با فشار تجزیه شده و از بین رفته‌اند.

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

۱- مقدمه

بکارگیری این فناوری در صنایع غذایی نیازمند شناخت سازوکار و سینتیک فشار در تخریب و نابودی و یا غیرفعال کردن میکروارگانیسمها، آنزیمها و پروتئینها می باشد [۱ و ۲]. اولین گزارشها در مورد تأثیر فشار ایزواستاتیک بر میکروارگانیسمها توسط Cretes در سال

استفاده از فرآیند فشار بالا یک امکان بالقوه برای فرآوری و نگهداری مواد غذایی به شمار می آید. این فرآیند قادر به غیرفعال ساختن میکروارگانیسمها و آنزیمها بوده و

E-mail: moreza1937@yahoo.com

* مسؤول مکاتبات:

Kilbanov ۱۹۸۳ ثابت آنزیم اینورتاز حاصل از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* تحت فشارهای بالا را مورد بررسی قرار داد و دریافت که در دامنه ۲۵۰ مگاپاسکال آنزیم دارای ثابت نسبی بوده و نیمه عمر^۱ این آنزیم 15 ± 200 دقیقه است و برای غیرفعال شدن نیازمند فشارهای بالاتر می باشد (۱۲ و ۱۳).

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 در صنایع تخمیری و بخصوص صنایع پخت دارد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- خالص سازی و تهیه استوک حاوی سویه

موردآزمایش: مخمر نانوائی 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 ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. از پرگنه های 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 پرگنه های تکی انتخاب شدند و از این پرگنه ها بر روی محیطهای شیب دار PDA در تیوپ کشت به عمل آمد پس از گرمخانه گذاری و رشد بر روی این محیطها، لوله های آزمایش به عنوان منبع کشت خالص مورد استفاده قرارگرفت به این ترتیب ۸ کشت

۱۸۸۳ منتشر گردید. او باکتریهای زنده ای را در عمق ۵۱۰۰ متری دریا مشاهده نمودار [۳] همچنین اثر استفاده از فشار بالا برای نگهداری شیر توسط Hite و همکاران در دانشگاه ویرجینیای غربی مورد بررسی قرار گرفت [۴] اصولاً سلولهای رویشی مخمرها و کپکها نسبت به فشار حساس هستند و در فشارهای ۶۰۰-۳۰۰ مگاپاسکال 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 که هاگهای باکتریها مقاوم ترین اشکال میکروبی نسبت به فشار به شمار می آیند [۵]. در این بین اعمال فشارهای کمتر از حد کشندگی در میکروارگانیسمها سبب تغییر در فعالیتهای حیاتی و متابولیکی آنها می شود مثلاً "اعمال فشارهای ۲۰۰ تا ۴۰۰ مگاپاسکال سبب جوانه زنی اسپور باکتریها و یا اعمال فشارهای ۲۰۰-۵۰۰ 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 ($10^6 \times 5$ سلول در میلی لیتر) در فاز لگاریتمی می گردد و فشار بیش از ۴۰ مگا پاسکال تقسیم سلولی را کاملاً متوقف می سازد [۶ و ۷]. 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 [۸ و ۹] مشاهده شده است که فشار ایزواستاتیک ۶۰ 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 [۱۰ و ۱۱] در سال

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

2- Potato Dextrose Agar

۳-۲ فعالیت آنزیمی مخمر

۵۰۰ میکرولیتر از تعلیق مخمر (معادل عدد ی مقیاس McFarlane) به ارلن مایرهای حاوی ۵۰ میلی لیتر ساکارز ۰/۴ مولار در شرایط سترون افزوده شد. (جمعیت میکروبی حدود $10^6 \pm 1$) ارلنها به گرمخانه $10 \pm 25^\circ\text{C}$ منتقل گردید. پس از ۴ ساعت گرمخانه گذاری ارلنها را خارج کرده و پس 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^۱ 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 قرار داده شد و 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 550nm توسط طیف سنج نوری (UV-VIS. Shimatzu) قرائت گردید. هم چنین به منظور انجام مقایسه منحنی استاندارد گلوکز نیز تهیه گردید [۱۶]

۲-۴ 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

مخمر در ۳ تکرار تهیه گردید. از منبع مخمر که قبلاً^۲ 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^۱ در لوله‌ها تلقیح گردید. پس از طی دوره گرمخانه گذاری یک میلی لیتر از آن به ارلن مایرهای حاوی ۱۰۰ میلی لیتر YPD^۱ تلقیح شد. و مجدداً گرمخانه گذاری گردید (۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت). سلولهای مخمر از 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 (pH=۷) سه بار شستشو شدند و سپس در مقیاس McFarlane^۲ تعلیق مورد نظر آماده شد. از تعلیق به لوله‌های درب دار سترون در حجمهای ۱/۵ میلی لیتر منتقل گردید [۱۴].

۲-۲ فرآیند اعمال فشار

برای تحت فشار قراردادن نمونه‌ها از پرس ایزواستاتیک مدل Dorst2000 ساخت کارخانه Dorst- Maschinen and An Angen Bov کشور آلمان استفاده گردید. نمونه‌های حاوی تعلیق مخمر در حدود ۱۰۸ سلول میلی لیتر به میزان ۱ 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 فشار ایزواستاتیک 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 ۲۴ ساعت در درجه حرارت 4°C نگهداری و سپس مورد میزان CFU^۲، 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

3. Dinitro Salicilic acid

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 و تحلیل آماری قرار گرفت که در جدول (۱) میانگین مربعات و درجه آزادی هر یک از تیمارها و اثرات متقابل آنها آورده شده است.

گرفت و نمونه‌های شاهد و تیمار شده با فشار با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و به روش استاندارد SEM^۱ مورد مطالعه قرار گرفته و عکسبرداری به عمل آمد.

۲-۶ طرح آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از طرح بلوک کاملاً^۲ تصادفی به روش فاکتوریل استفاده گردید و میانگینهای بدست آمده از تجزیه آماری توسط آزمون چند دامنه ای دانکن^۳ در سطح $P \leq 0.05$ با یکدیگر مقایسه و کمترین حد اختلاف^۴ معنا دار برای هر کدام از تیمارها تعیین گردید

جدول ۱. میانگین مربعات تیمارها و اثرات متقابل آن

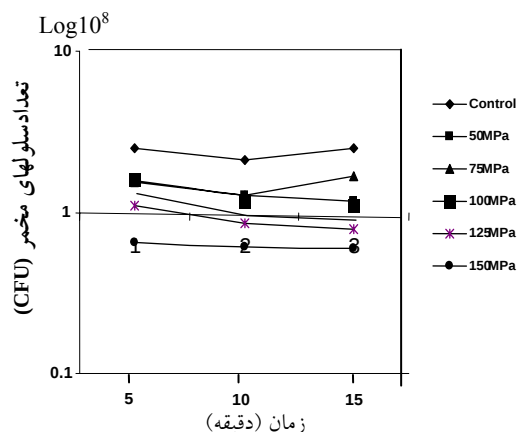
مشاهدات تیمارها	درجه آزادی	تعداد پرگنه در واحد	دی اکسید کربن	فعالیت آنزیمی
سطوح تکرار	۲	۰/۰۹۷ ns	۱۶/۶۷ ns	۱۲/۰۲۱ ns
سطوح میزان اعمال فشار	۵	۳/۹۰۴**	۴۲۶/۶۶۷**	۲۰۷/۰۲۷**
سطوح زمان اعمال فشار	۲	۰/۰۱۹ ns	۵۹/۷۲۲ ns	۱/۰۹۳ ns
اثر مقابل فشار در زمان	۱۰	۰/۶۰۲**	۸۶/۳۸۹**	۳۴۰/۱۰**
میزان خطا	۳۴	۱۱۷	۸/۳۳۳	۲۶/۷۳۳

ns: فاقد اختلاف معنا دار آماری ** : دارای اختلاف کاملاً^۲ معنا دار آماری در سطح $P \leq 0.01$ * : دارای اختلاف معنا دار آماری در سطح $P \leq 0.05$

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 باشند در بررسی و مقایسه میانگینهای به دست آمده در صفات میزان اعمال فشار دوره اعمال فشار و اثرات متقابل آنها توسط آزمون چند دامنه 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 می شود [۱۷] تأثیر فشار بر فعالیت حیاتی سلولهای مخمر توسط محققانی چون Pandya و همکاران نیز بررسی گردیده است. آنها نشان دادند که فشارهای کمتر از ۶۰ 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

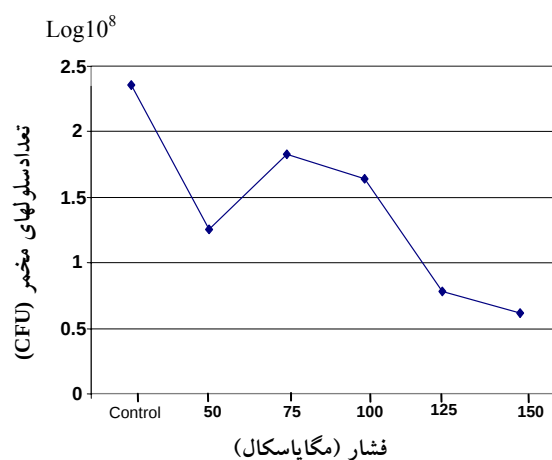
- 1- Scanning Electron Microscopy
- 2- Randomized Complete Block Design (RCBD)
- 3- Duncan Multiple Range Test
- 4- Least Significant Differences (LSD)



شکل ۲ اثر متقابل میزان و زمان اعمال فشار بر رشد سلولهای مخمر

Gould و همکاران یکی از موارد عمده مرگ میکروارگانیسمها را نگهداشتن آنها تحت فشار بر شمردند (۲۱ و ۲۲). 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 میکروارگانیسمها در مقابل فشار کاهش یافته و غیرفعال می شوند [۲۳ و ۲۴]. شدت اعمال فشار عامل بسیار موثر در کاهش تعداد سلولها در هنگام نگهداری سلولهای میکروبیها تحت فشار می باشد. بعضی از محققین معتقدند که سلولهای مخمر در فشارهای پایین (کمتر از ۶۰ مگاپاسکال) حتی به مدت یک ساعت کاهش قابل ملاحظه ای ندارند اما با افزایش فشار در زمانهای ۵ دقیقه و کمتر (۱۵۰ مگاپاسکال به بالا) غیر فعال می گردند در صورت اعمال فشار ۲۵۰ مگاپاسکال بیشتر از ۹۰ درصد سلولهای مخمر غیرفعال شدند [۲۵]. اعمال فشارهای ۵۰ و ۷۵ مگاپاسکال هیچگونه تأثیری بر تولید دی اکسید کربن توسط مخمر نداشته اند اما در فشار ۱۰۰ مگاپاسکال 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 در دامنه این فشار افزایش

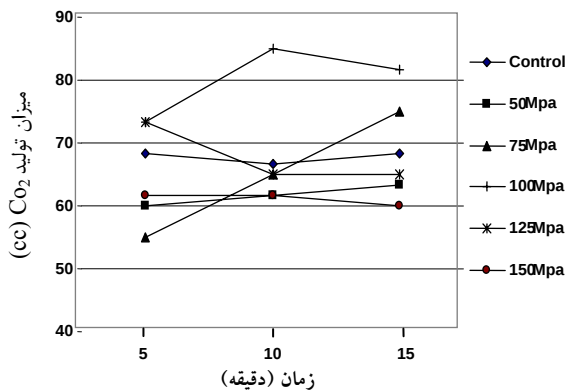
به فشار مؤثر بوده و سبب کاهش فعالیت حیاتی آنها شده است. بطوریکه در محدوده فشارهای ۴۰ مگاپاسکال در فاز لگاریتمی تقسیم سلولی به طور کامل متوقف شده است. علاوه بر این مخمرها به دلیل بزرگی قطر سلول نسبت به باکتریها به فشار، حساس ترند بطوریکه اعمال فشارهای بیش از ۱۵۰ مگاپاسکال سبب مرگ کامل سلول مخمر می شود Rosin & Zimmerman مشاهده کردند که اعمال فشار هیدرواستاتیک از بالاتر از ۱۰۰ مگاپاسکال سبب تخریب ساختمانهای حیاتی سلول *Saccharomyces cerevisiae* می گردد 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].



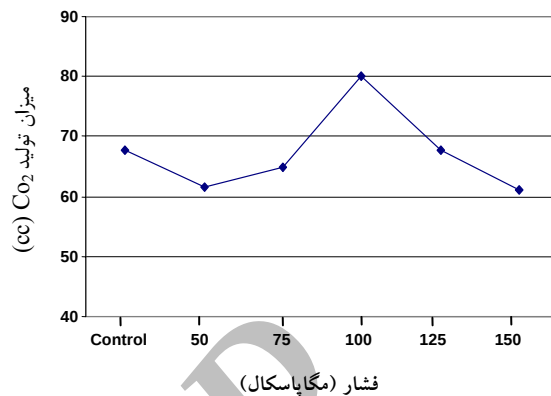
شکل ۳ اثر فشار ایزواستاتیک بر تعداد سلولهای مخمر

با افزایش زمان و میزان فشار تعداد سلولهای مخمر دچار کاهش قابل ملاحظه ای شدند. در ۵ دقیقه اعمال فشار ۱۲۵ مگاپاسکال 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 اندازه یک چرخه لگاریتمی بوده است (شکل ۲).

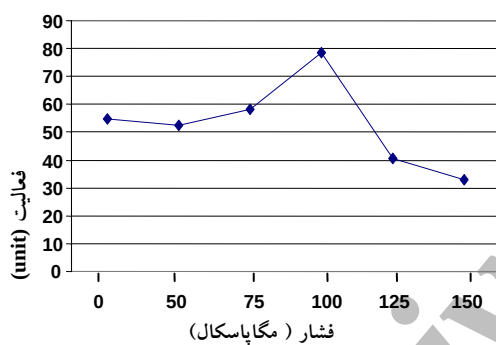
یافته است.



شکل ۴ اثر میزان و زمان اعمال فشار بر تولید دی اکسید کربن توسط مخمر



شکل ۳ اثر میزان فشار بر تولید دی اکسید کربن مخمر



شکل ۵ 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 ۱۰۰ MPa 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 ۶۰-۴۰ مگا پاسکال سبب کاهش pH واکنش در حدود ۰/۳۳ واحد می شود و این کاهش pH حضور گلوزک صورت می پذیرد. pH سیتوپلاسم سلول نیز تمایل به کاهش نشان می دهد که نقش مهمی در فعالیت حیاتی سلول خواهد داشت. اسیدی شدن سیتوپلاسم در دامنه کمتر از ۱۰۰ MPa ادامه می یابد که ظاهراً سبب

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 ۴).

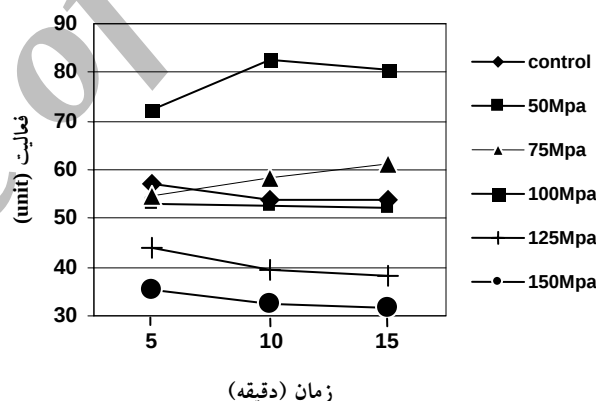
میزان فعالیت آنزیمی در فشارهای ۵۰ و ۷۵ مگا پاسکال برابر فعالیت آنزیمی نمونه های شاهد می باشد اما در صورت اعمال فشار MPa ۱۰۰ فعالیت آنزیمی افزایش یافته در فشارهای بالاتر یعنی MPa ۱۲۵ و ۱۵۰ مجدداً کاهش نشان می دهد بطوریکه فعالیت آنزیمی در MPa ۱۵۰ به حداقل مقدار نسبت به شاهد می رسد (شکل ۵).

دامنه کمتر از ۱۰۰ MPa ادامه می یابد که ظاهراً سبب واکنش و تحریک ترشحات متابولیکی مخمر می گردد. در شکل (۶) مشاهده می شود اعمال فشار ایزواستاتیک تا مقادیر کمتر از ۷۵ پاسکال اثر چندانی بر فعالیت آنزیمی ندارد. اما با افزایش شدت و نیز زمان اعمال فشار از ۷۵ مگاپاسکال تا ۱۰۰ MPa فعالیت آنزیمی افزایش می یابد و مجدداً در فشار ۱۲۵ MPa 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 نقش دارد فشار می تواند عملکرد هیدرولیتیکی آنزیمها را از طریق تغییر مسیر تنظیم سرعت و یا از طریق تنظیم قابلیت انتخابی آنزیم اصلاح نماید. افزایش ثبات آنزیمها در برابر دنا تراسیون ناشی از اعمال فشار اهمیت زیادی در فعالیتهای بیولوژیکی جهت تغییر و تبدیل آنزیمی در فشار بالا دارد [۲۶].

۲-۳ مشاهدات با میکروسکوپ الکترونی

بررسی اثر فشار ایزواستاتیک بالا بر ساختمان و ریخت شناسی سلول مخمر توسط میکروسکوپ الکترونی نشان می دهد که به تدریج با افزایش فشار طول سلول مخمر افزایش می یابد و در مقایسه با سلولهای شاهد این تغییر ریخت شناسی کاملاً مشهود است. شکل (۷) تصویر سلولهای مخمر را در حالتی که هیچگونه فشاری بر آنها وارد نشده است نشان می دهد. بطوریکه ملاحظه می گردد از نظر ریخت شناسی سطح سلولها صاف و تخم مرغی شکل بوده و هیچگونه آثار ناشی از اثر عوامل خارجی بر سلول مشاهده نمی گردد. مطابق شکل (۸) فشار ۵۰ مگا پاسکال در مدت ۱۵ دقیقه توانسته است اندکی تغییرات در بعضی از سلولهای مخمر ایجاد نماید. این تغییرات شامل افزایش طولی و در بعضی بزرگ شدگی سلول می باشد که این تفاوتی که در عکس العمل سلولها نسبت به فشار که در این دامنه ظاهر می شود احتمالاً به دلیل اختلاف در زمان تقسیم سلولی می باشد شکل ۸ تصویر میکروگراف الکترونی را ۲۴ ساعت پس از اعمال فشار ۵۰ MPa و نگهداری در ۴ C° نشان

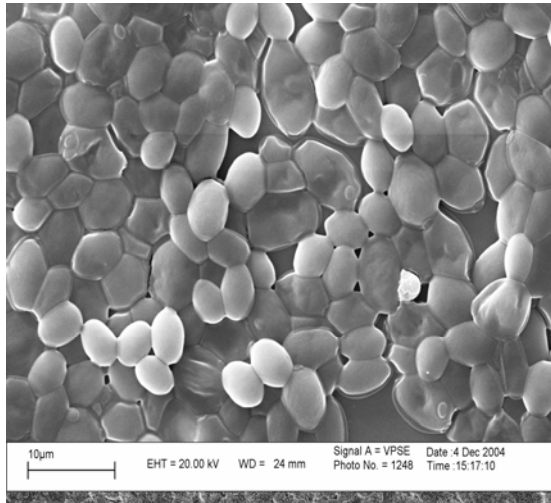
واکنش و تحریک ترشحات متابولیکی مخمر می گردد. در شکل (۶) مشاهده می شود اعمال فشار ایزواستاتیک تا مقادیر کمتر از ۷۵ پاسکال اثر چندانی بر فعالیت آنزیمی ندارد. اما با افزایش شدت و نیز زمان اعمال فشار از ۷۵ مگاپاسکال تا ۱۰۰ MPa فعالیت آنزیمی افزایش می یابد و مجدداً در فشار ۱۲۵ MPa و ۱۵۰ کاهش نشان می دهد. آمار و ارقام به دست آمده نشان می دهد که فشار ایزواستاتیک در تنظیم فعالیت و ثبات برخی از آنزیمها نقش دارد فشار می تواند عملکرد هیدرولیتیکی آنزیمها را از طریق تغییر مسیر تنظیم سرعت و یا از طریق تنظیم قابلیت انتخابی آنزیم اصلاح نماید. افزایش ثبات آنزیمها در برابر دنا تراسیون ناشی از اعمال فشار اهمیت زیادی در فعالیتهای بیولوژیکی جهت تغییر و تبدیل آنزیمی در فشار بالا دارد [۲۶].



شکل ۶ اثر زمان و فشار بر فعالیت آنزیمی *S. cerevisiae*

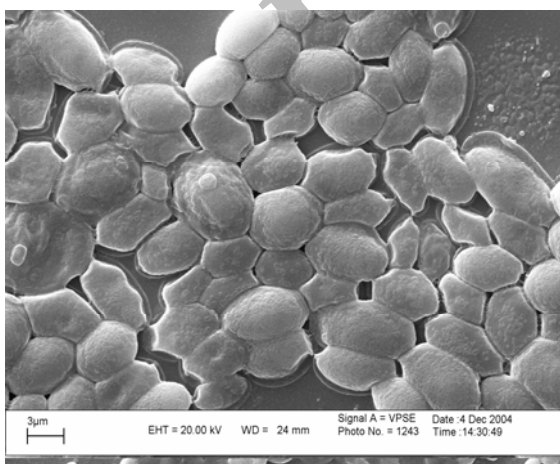
اعمال فشار در مقادیر مختلف و زمانهای ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه بر فعالیت آنزیمی مخمر نشان می دهد که بالاترین فعالیت آنزیمی مربوط به اعمال فشار ۱۰۰ MPa در ۱۰ و ۱۵ دقیقه فشار می باشد و فشارهای بالاتر از این مقدار در زمانهای یاد شده کاهش قابل ملاحظه ای بر فعالیت آنزیمی مخمر دارد. فشارهای ۶۰-۴۰ مگا پاسکال سبب کاهش pH و اکوتل در حدود ۰/۳۳ واحد می شود و این کاهش pH حضور گلوکز صورت می پذیرد. pH سیتوپلاسم سلول نیز تمایل به کاهش نشان می دهد که نقش مهمی در فعالیت حیاتی سلول خواهد داشت. اسیدی شدن سیتوپلاسم در

شده در فشار ۷۵ مگا پاسکال تغییرات سطحی در دیواره سلول مخمر کاملاً قابل مشاهده است.



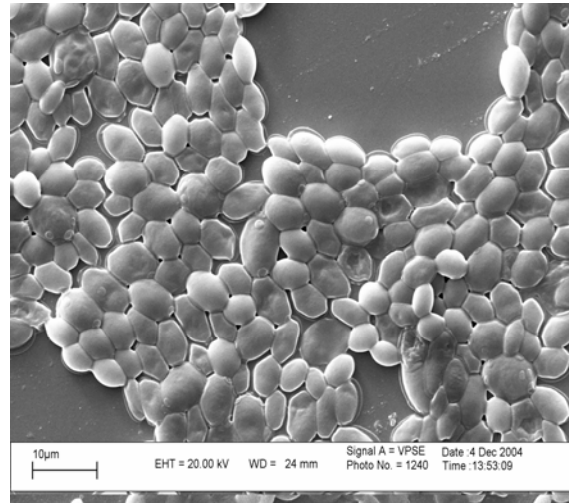
شکل ۸ سلولهای مخمر *S. cerevisiae* تحت فشار ۵۰ MPa

شکلهای (۱۱ و ۱۲) تصاویر میکروگراف الکترونی را اعمال فشار ۱۵۰ و ۱۲۵ MPa 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 و بالاخره نابودی مخمر می باشد. این نتایج توسط دیگر محققین نیز تأیید شده اند (۲۷)



شکل ۹ سلولهای مخمر *S. cerevisiae* در ۷۵ MPa فشار

می دهد. هم چنین یک نوع تجمع سلولها ناشی از تنش ایجاد شده بر اثر فشار دیده می شود. در بعضی از سلولهای تیمار



شکل ۷ سلولهای مخمر *S. cerevisiae* سالم و بدون اعمال فشار (شاهد)

به علاوه همانطور که در شکل (۹) مشاهده می شود تجمع سلولی بیشتر شده است به طوری که کناره های دیواره سلولی مخمر فرو رفته با اشکال منظم و یا نامنظم هندسی به خود گرفته اند. که در تصویر میکروگراف الکترونی ۲۴ ساعت پس از اعمال فشار ۷۵ MPa قابل مشاهده است. شکل (۱۰) تصویر میکروگراف الکترونی را بر اثر اعمال فشار در ۱۰۰ MPa نشان می دهد در فشار ۱۰۰ مگا پاسکال 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 بر اثر واکنش شدید سلولها در مقابل این دامنه فشار می باشد. می توان گفت که تقریباً کلیه سلولها تحت تأثیر فشار ۱۰۰ مگا پاسکال دچار تنش شدید شده اند. ایجاد تغییرات در فشارهای ۱۲۵ و ۱۵۰ مگا پاسکال به قدری شدید شده اند که منجر به غیر فعال شدن و نابودی کامل سلولهای مخمر شده است، و کاهش فعالیت متابولیکی آن شاید به دلیل غیر فعال شدن اکثر فعالیتهای حیاتی سلول مخمر باشد و به نظر می رسد

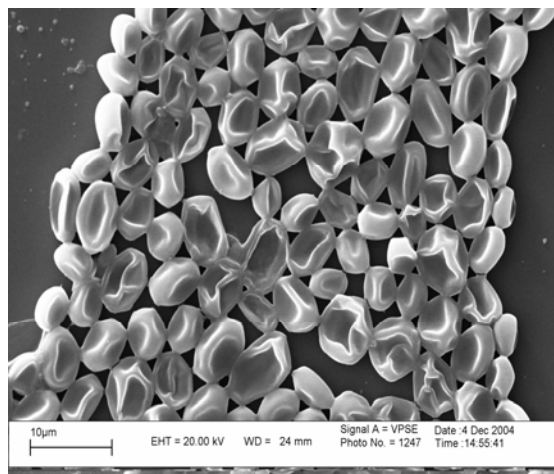
بررسی اثرات فشار بر سلول مخمر پس از یک ماه نگهداری در 4°C توسط میکروسکوپ الکترونی: مشاهدات میکروسکوپی با میکروسکوپ الکترونی پس از یک ماه نگهداری در حرارت یخچال نشان می دهد که سلولهای مخمر در فشارهای ۵۰ و ۷۵ مگا پاسکال نسبت به شاهد چندان تغییری نمی کنند (اشکال ۱۳، ۱۴) اما کلیه سلولهای مخمر تیمار شده در فشارهای 100 MPa و 125 MPa به بالا پس از یک ماه به طور کلی نابود شده و از بین می روند (اشکال ۱۵ و ۱۶) این نتایج از دو جنبه دارای اهمیتند.

الف: اعمال فشارهای بیش از 100 MPa نه تنها مفید نیستند بلکه سبب نابودی کامل مخمرها در دراز مدت می گردد که نتیجه آن تغییرات مضر و شدید درون سلولی می باشد و فشارهای کمتر از این مقدار تأثیر چندان مضری ندارند [۲۸].

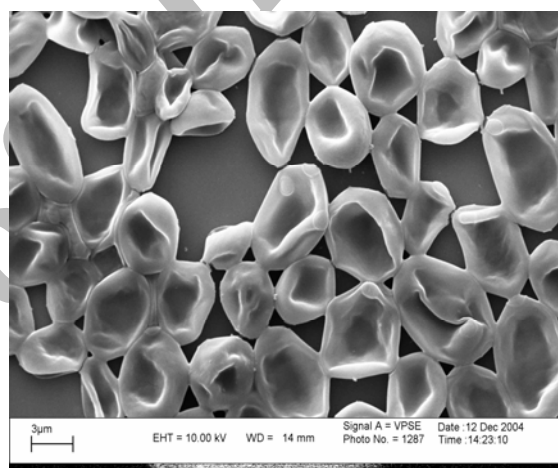
ب: با استناد به این نتایج و تحقیقات تکمیلی می توان امیدوار بود که با استفاده از فشارهای نه چندان بالا و درمانه 125 و 150 MPa که هیچگونه تغییر محسوسی در کیفیت مواد غذایی ندارند و به علاوه هزینه چندان گرانی را در بر ندارند و می توان سلولهای مخمر را در فرآورده های نظیر آب میوه که مضر شناخته می شوند غیر فعال نمود [۲۸ و ۲۹].



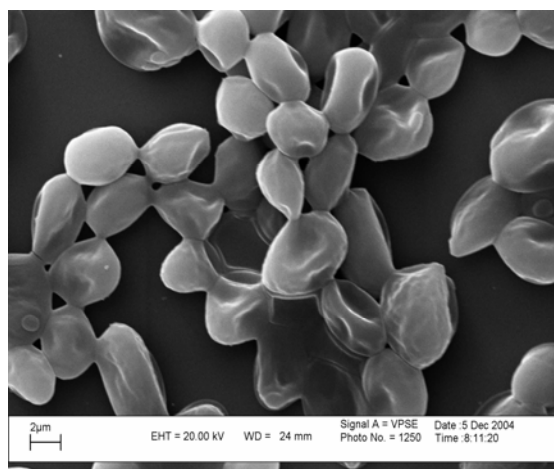
شکل ۱۳ تصویر از مخمر شاهد پس از یکماه نگهداری در 4°C



شکل ۱۰ سلولهای مخمر *S.cerevisiae* در 100 MPa فشار



شکل ۱۱ سلولهای مخمر *S.cerevisiae* در فشار 125 MPa

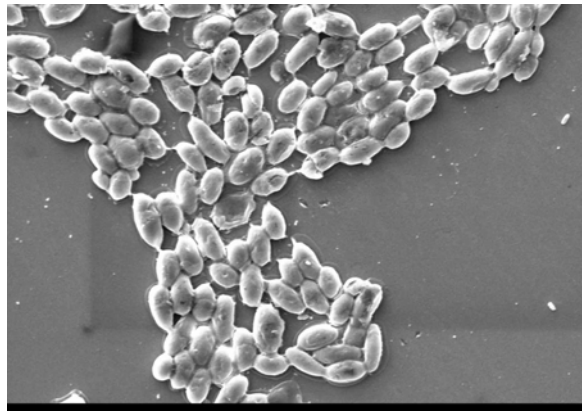


شکل ۱۲ سلولهای مخمر *S.cerevisiae* در فشار 150 MPa

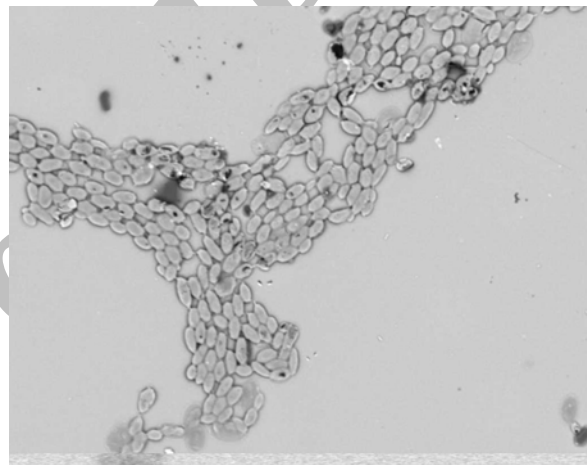
بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که اعمال فشارهای پائین و متوسط (کمتر از ۱۰۰ مگاپاسکال) بیشتر سبب تحریک سلولهای مخمر شده و بر اثر تحریک واکنشهای متابولیکی، تقسیم سلولی و ساختار فیزیولوژیک سلول دچار تغییراتی می‌گردد که از جمله اسیدی شدن سیتوپلاسم و واکوئل، اختلال و یا تحریک تقسیم سلولی، ایجاد جهش و بالاخره تحریک ترشح بیشتر متابولیتها و در نتیجه تشدید فعالیت آنزیمی مخمر ساکارومایسس می‌گردد. این تغییرات در حضور بعضی از افزودنیها نظیر قندها، پلی‌اولها و یا ترکیبات غنی‌کنند. یا بازدارنده به صورت متفاوتی اتفاق می‌افتد (۲۸ و ۲۹). مثلاً "حضور قندها اثر محافظت‌کنندگی روی پایداری آنزیمها دارد از طرف دیگر فشارهای ۵۰ مگا پاسکال و کمتر تأثیر چندانی روی این قبیل واکنشها ندارند لذا می‌توان 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 غذایی و بررسی فعالیت آنزیمی در حضور مواد افزودنی برای اطمینان از حصول نتایج لازم است.

۴- نتیجه‌گیری کلی

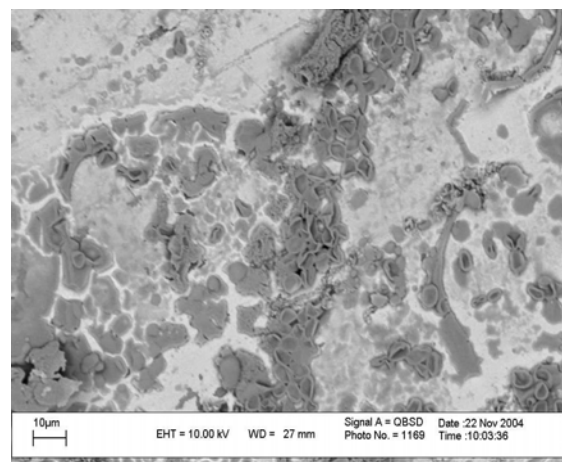
استفاده از فناوریهای نوین از جمله اعمال فشارهای بالا سبب تحولات اساسی در بعضی از فرآوردهای مواد غذایی از جمله سالم سازی غیرحرارتی، بهبود ویژگیهای کیفی، بافتی و ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی می‌گردد. از طرف دیگر، فشارهای پائین و متوسط قادرند موجب تحریک بعضی از میکروارگانیسمها شده و در آنها ایجاد تنش نموده 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 ۵۰ و ۷۵ مگاپاسکال بدون تغییر می‌مانند اما فشار ۱۰۰ مگاپاسکال تنش زیادی در این سلولها ایجاد



شکل ۱۴ تصویر مخمر تحت فشار ۷۵ MPa پس از یکماه نگهداری در ۴°C



شکل ۱۵ تصویر سلولهای مخمر تحت فشار ۱۰۰ MPa پس از یکماه نگهداری در ۴°C



شکل ۱۶ تصویر سلولهای مخمر *S.cerevisiae* بر اثر اعمال فشار ۱۲۵ MPa پس از یک ماه نگهداری در دمای ۴°C

- function. Prot. Struct. Funct 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 l'action des pressions sur les phenomenens dela sur lavitalite des microorganisms de eau douce 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.

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 و علاوه 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 کمتر ۱۰۰ MPa مشاهده 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 در دامنه 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 شود جزو 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 و گروه مواد و سرامیک پارک علم و فناوری خراسان به دلیل در اختیار قرار دادن 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 می گردد.

۶- منابع

- [1] Mochaer. V. V., Heremans, K., Frak, J., Masson. P., and Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and

- induced autolysis. FEMS Microbiol. Lett. 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 غذایی. 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.
- [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-

- 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.
- [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

Archive of SID

Activities and morphology of *saccharomyces cerevisiae*

Seyyed Ali Mortazavi^{1*}, Abdol Majid Maskooki², Amir Ghandi³, Arash Koocheki³,
Javad Barooei³

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 and 15 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,

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