مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال چهارم، شماره۴، زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۸-۱

بررسی مقاومت به استرس در سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* به منظور طراحی محیط‌های غربال‌گر

محسن گلابی[۱]، ایرج نحوی[۲]، منوچهر توسلی[۳]، محسن مبینی دهکردی[۴]

۱- نویسنده مسئول: دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان پست الکترونیکی: mohsen.golabi@gmail.com
۲- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۴- استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۹

چکیده

سابقه و هدف: برای دست‌یابی به سویه‌های میکروبی با صفات ویژه صنعتی دو روش عمده وجود دارد: جداسازی سویه مورد نظر از محیط یا القای جهش در سویه‌های صنعتی و جداسازی سویه‌ای با صفات مورد نظر. اما بررسی خصوصیات مطلوب مورد نظر در همه سویه‌های جداسازی شده، بسیار پرهزینه و زمان‌بر است. هدف از این تحقیق، بررسی میزان مقاومت به عوامل استرس‌زا در سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* و بررسی ارتباط آن با ویژگی‌های مطلوب صنعتی، مانند مقاومت به فشار اسمزی و تولید بالاتر میزان درون سلولی ترهالوز در جهت طراحی محیط‌های غربال‌گر به منظور هدفمند کردن جداسازی سلول‌هایی با ویژگی‌های ذکر شده از یک جمعیت میکروبی است.

مواد و روش‌ها: میزان مقاومت سویه‌های مختلف *ساکارومایسس سرویزیه* با روش تعیین درصد بقای سلولی در مواجه با استرس‌های ناشی از 3M NaCl ، ۴۰٪ Sorbitol ، شوک سرما در دمای ۲۰°C - و شوک حرارتی ۵۲°C تعیین شد. میزان تجمع درون سلولی ترهالوز با معرف آنترون اندازه‌گیری شد و ارتباط این عوامل با استفاده از آنالیز داده‌های آماری بررسی شد.

یافته‌ها: همبستگی شدیدی بین میزان مقاومت به شوک حاصل از NaCl و شوک حاصل از سوربیتول در میان سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* مشاهده شد. این ارتباط در سطح ۹۹٪ معنی‌دار بود ($p< 0.01$). همچنین، ارتباط میزان تجمع درون سلولی ترهالوز با قدرت بقای سلولی در هنگام بروز استرس شوک حرارتی در سطح ۹۹٪ معنی‌داری قرار داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به ناکارآمد بودن عوامل قندی در جداسازی سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی، با استفاده از NaCl به‌عنوان عامل غربال‌گر می‌توان سویه‌های مقاوم‌تر به فشار اسمزی را از میان یک سوسپانسیون سلولی به طور هدفمند جداسازی کرد، همچنین، عامل غربال‌گر شوک حرارتی برای جداسازی هدفمند سویه‌هایی که میزان تجمع ترهالوز درون سلولی بالاتری دارند، بسیار کارآمد است.

واژگان کلیدی: محیط‌های غربال‌گر، *ساکارومایسس سرویزیه*، استرس، ترهالوز، فشار اسمزی

• مقدمه

یکی از روش‌های دستیابی به سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* با خصوصیات صنعتی مطلوب، جداسازی سویه‌های وحشی از محیط و مواد غذایی گوناگون (۱) یا جهش‌زایی تصادفی با به‌کارگیری مواد و تابش‌های جهش‌زا و متعاقب آن، جداسازی سویه‌هایی با صفات مورد نظر است (۳، ۲). در این دو روش، مرحله غربال‌گری و جداسازی برترین سلول‌ها از میان یک جمعیت میکروبی که حاوی میلیون‌ها سلول با صفات متنوع است، اهمیت بالایی دارد. طراحی روش‌ها و محیط‌های غربال‌گر کارآمد در این مرحله به تسهیل و تسریع در جداسازی هدفمند سلول‌های مورد نظر منجر می‌شود (۴). پاسخ سلولی به استرس، بسیار پیچیده است و ژن‌های دخیل در مقاومت به استرس در همه ژنوم پراکنده هستند.

بیان ژن‌های متعددی با استفاده از روش های نوین زیست شناسی ملکولی در هنگام استرس شناسایی شده

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-20]

است. مطالعات نشان داده که در حدود ۱۵٪ از ژنوم *ساکارومایسس سرویزیه* کد کننده‌ی عوامل دخیل در مقاومت به استرس است (۵). مخمرها در هنگام بروز هر نوع استرس پاسخ های جداگانه‌ای را بیان می‌کنند؛ اما این پاسخ‌ها در برخی موارد مشترک هستند که به ایجاد مقاومت به یک عامل استرس‌زا در اثر مواجه با یک عامل استرسی دیگر منجر می‌شود. به طور مثال اِعمال شوک حرارتی ملایم سبب بروز پاسخ‌هایی می‌شود که علاوه بر محافظت سلول‌ها در برابر شوک حرارتی شدیدتر، سلول‌ها را در برابر اتانل نیز مقاوم می‌کند یا شوک اسمزی سبب بیان فاکتورهایی می‌شود که سلول‌های مخمری را در برابر شوک حرارتی هم مقاوم می‌سازد این پدیده cross-protection نامیده می‌شود (۶).

سلول‌های *ساکارومایسس سرویزیه* در کاربردهای صنعتی با استرس‌های متفاوتی مواجه هستند. تولید بیواتانل و تولید مخمر نانوایی دو صنعت مهم مرتبط با *ساکارومایسس سرویزیه* است و در هر دو صنعت، سویه‌های مقاوم به استرس فشار اسمزی راندمان تولیدی بیشتری دارند (۹-۷). به دلیل قابلیت رشد *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط‌های حاوی غلظت‌های بالای قندی، غربالگری سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی توسط عامل غربال‌گر قندی امکان‌پذیر نیست بنابراین، برای دست‌یابی به سویه‌های مقاوم در میان یک جمعیت میکروبی نیاز به بررسی تک تک سلول‌های موجود بررسی شوند (۱۲-۱۰). اما جایگزینی عوامل استرس‌زایی که با عامل فشار اسمزی ناشی از قندها دارای cross-protection باشد، می‌تواند منجر به جداسازی هدفمند سلول مورد نظر شود. این روش پیشنهادی در جداسازی سویه‌هایی با صفات مطلوب صنعتی (مانند سویه‌های تولید کننده متابولیت‌های ثانویه)که به طور مستقیم قابل غربال‌گری نیستند، کاربردهای وسیعی دارد.

ترهالوز یک دی ساکارید غیر احیا کننده است و مطالعات متعدد نشان داده است که در هنگام استرس‌های مختلف میزان تجمع درون سلولی این ماده افزایش می‌یابد و تأثیر آن در ایجاد مقاومت به استرس‌های متعدد به اثبات رسیده است (۱۳). سویه‌هایی که مقادیر بالایی ترهالوز درون سلولی دارند، از نظر صنعتی مورد توجه هستند (۱۵، ۱۴). جداسازی این سویه‌ها در میان یک جمعیت سلولی به طور مستقیم و هدفمند امکان‌پذیر نیست. هدف از این تحقیق، تعیین میزان مقاومت به استرس‌های متعدد و بررسی ارتباط میزان مقاومت به استرس در سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* با صفات ویژه صنعتی به منظور طراحی محیط‌های غربال‌گری است که به طور هدفمند بتواند به جداسازی سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی و جداسازی سویه‌هایی با مقدار درون سلولی ترهالوز بالاتر در یک جمعیت سلولی بیانجامد.

• مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌ها و محیط‌های کشت: سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* از نمونه‌های مخمر نانوایی تجاری جداسازی و با حروف R، I، F، M، K و S نام گذاری شدند، همچنین، سویه استاندارد *ساکارومایسس سرویزیه* از کلکسیون میکروبی ایران (PTCC) با کد ۵۰۸۰ با نام سویه P مورد آزمایش قرار گرفت.

از محیط YPD (۲٪ گلوکز، ۲٪ پپتون و ۱٪ عصاره مخمر) برای کشت سویه‌ها استفاده شد. در ساخت محیط جامد میزان g/l ۱۸ آگار به محیط مایع اضافه شد. این محیط در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد.

تعیین میزان مقاومت در برابر شوک NaCl : سویه‌ها در محیط YPD تلقیح شدند و گرمخانه‌گذاری (۳۰°C و ۱۵۰rpm) به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. ۱ml از این سوسپانسیون، سانتریفوژ (۵min، ۳۰۰۰g) و مایع رویی دور ریخته شد، سپس ۵ ml محلول NaCl (۳مولار) به توده زیستی موجود در لوله اضافه شد و پس از یکنواخت شدن (ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه) سری رقت در آب پپتونه تهیه شد. کشت به روش استاندارد پلیت کانت در پلیت YPD از این سوسپانسیون انجام گرفت تا تعداد سلول اولیه تعیین شود. این محیط در شرایط گرمخانه (۳۰°C به مدت ۶۰ دقیقه) قرار داده شد. پس از این زمان، دوباره سری رقت وکشت انجام شد. تعداد کلنی‌ها پس از ۴ روز انکوبه‌گذاری در دمای ۳۰°C شمارش شد. میزان مقاومت سویه‌های مختلف در برابر شوک NaCl بر

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-20]

حسب درصد بقای هر سویه پس از اعمال شوک NaCl محاسبه و گزارش شد.

تعیین میزان مقاومت در برابر فشار اسمزی: مراحل انجام آزمایش دقیقاً مطابق با اعمال شوک ناشی از NaCl انجام شد، ولی به جای استفاده از محلول NaCl از محلول۴۰ درصد سوربیتول (وزنی/حجمی) استفاده شد. مدت زمان اعمال استرس ۲۴ ساعت بود (۱۶).

تعیین میزان مقاومت به شوک حرارتی: سویه‌های مخمر در شرایط ۳۰°C و ۱۵۰rpm کشت شد. پس از ۴۸ ساعت به منظور تعیین تعداد سلول‌های اولیه از این محیط، سری رقت تهیه شد و کشت به روش استاندارد پلیت کانت انجام گرفت. ۱ml از سوسپانسیون سلولی در یک لوله آزمایش استریل ریخته شد و در حمام آب گرم با درجه حرارت ۵۲°C به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. پس از اِعمال این استرس، سری رقت تهیه شد و کشت در پلیت YPD انجام شد. پس از گرمخانه‌گذاری تعداد کلنی ها شمارش شد و درصد بقای سلولی محاسبه و گزارش شد (۱۷).

تعیین درصد بقای سلولی در اثر ذخیره‌سازی در سرما: سویه‌های مخمر در شرایط ۳۰°C و ۱۵۰rpm کشت شد. پس از ۴۸ ساعت به منظور تعیین تعداد سلول‌های اولیه از این محیط، سری رقت تهیه شد و کشت با روش استاندارد پلیت کانت انجام گرفت. نمونه‌های ۱ میلی‌لیتری از سوسپانسیون سلولی در لوله‌های آزمایش استریل ریخته شد. لوله‌های آزمایش در دمای ۲۰°C - ذخیره‌سازی شد. سپس در زمان‌های معین از فریزر خارج و در دمای محیط قرار داده شد، تا ذوب شود. سری رقت، تهیه شد و کشت به روش استاندارد پلیت کانت انجام گرفت. تعداد کلنی‌ها پس از ۴ روز انکوبه‌گذاری در دمای ۳۰°C شمارش شد و درصد بقای سلولی محاسبه و گزارش شد.

اندازه گیری میزان ترهالوز درون سلولی: مقدار ترهالوز درون سلولی سویه‌های مخمر براساس روش هاریسون و ترولیان انجام شد (۱۸). سلول‌های مخمر در محیط مایع YPD کشت شد تا به فاز سکون رشد برسد. سپس نمونه‌های ۵ میلی لیتری از محیط کشت تهیه شد و پس از سانتریفوژ و دور ریختن محلول رویی، توده زیستی باقی‌مانده با آب مقطر سرد دو بار شست و شو داده شد. در همه مراحل بعدی لوله‌های حاوی توده زیستی مخمر در مخلوط آب و یخ نگهداری شد. پس از شست و شو و دور ریختن مایع رویی به لوله آزمایش حاوی توده زیستی مخمری ۴ml محلول تری کلرواستیک اسید ۰/۵ مولار سرد اضافه شد. محتویات لوله هر ۱۰دقیقه یک بار به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه نمونه‌ها سانتریفوژ شد (۱۰min, ۵۰۰۰g) و مایع رویی به بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتری تمیز انتقال یافت. به توده زیستی باقی مانده دوباره ۴ml محلول تری کلرواستیک اسید اضافه و مراحل قبلی تکرار شد.

پس از ۳ مرتبه تکرار این مراحل و جمع آوری محلول رویی، محلول به دست آمده توسط آب مقطر سرد به حجم ۵۰ml رسانده شد . ۱ml از این محلول به یک لوله آزمایش تمیز انتقال داده شد و ۵ml محلول معرف آنترون (۰/۸gr آنترون در ۵۰۰ ml اسید سولفوریک با غلظت ۲۷/۴ نرمال) به آن اضافه شد. این نمونه پس از ورتکس شدید به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت.

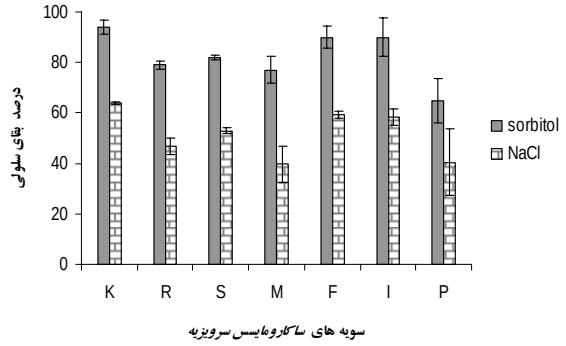
در خاتمه، میزان جذب نوری محلول سبزرنگ حاصل در طول موج ۶۲۰nm (در برابر نمونه شاهد حاوی ۵ml محلول آنترون و ۱ml آب مقطر) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. با انتقال عدد حاصل به منحنی استاندارد، مقدار ترهالوز برحسب میلی‌گرم در نمونه ۵ میلی‌لیتری سلول‌های مخمر محاسبه شد. به منظور محاسبه میزان وزن خشک سلولی، از محیط کشت اولیه نمونه‌های ۵ میلی‌لیتری تهیه و وزن خشک این میزان سوسپانسیون محاسبه شد. در نهایت، میزان ترهالوز درون سلولی هر سویه بر حسب درصد ترهالوز موجود در وزن خشک سلولی محاسبه و گزارش شد.

آنالیز داده‌های آماری: به منظور انجام آنالیزهای آماری از روش‌های آزمون t و آنالیز واریانس استفاده شد و میزان معنی‌داری توسط آزمون دانکن تعیین شد. عملیات آماری با استفاده از نرم افزار $SPSS_{13}$ انجام شد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-20]

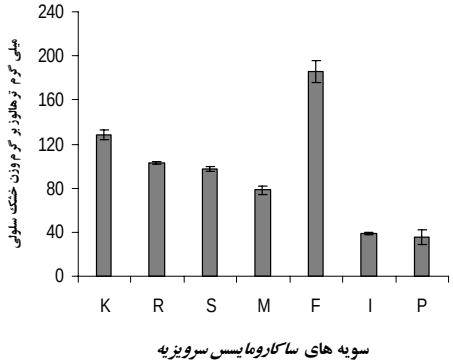
• یافته‌ها

میزان مقاومت سویه‌های صنعتی به شوک اسمزی ناشی از قند سوربیتول و NaCl: براساس نتایج به دست آمده که حاصل سه تکرار در هر آزمایش است، سویه‌ی K بالاترین مقاومت را در برابر شوک ناشی از NaCl و بالاترین درصد بقا را پس از اِعمال استرس فشار اسمزی ناشی از قند سوربیتول نشان داد. با توجه به نتایج حاصل (شکل ۱) درصد بقای سلولی سویه K پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در سوسپانسیون حاوی ۴۰٪ سوربیتول برابر با ۹۴٪ است. همچنین بقای سلولی این سویه در مواجه با شوک ۳ مولار NaCl برابر با ۶۴ ٪ است. با توجه به میزان ضریب همبستگی که از آنالیز داده‌های آماری مربوط به همه سویه‌ها به دست آمد، ارتباط بین میزان مقاومت به شوک حاصل از NaCl و شوک حاصل از سوربیتول در میان سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* در سطح ۹۹٪ معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$).

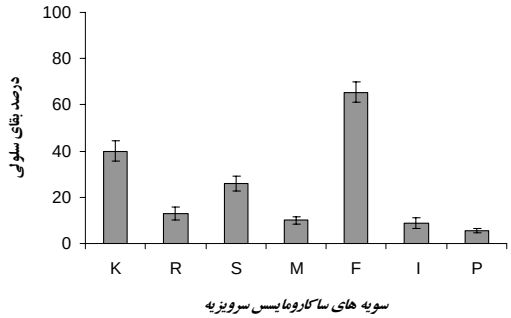


شکل ۱- درصد بقای سلولی سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* در مواجه با استرس شوک اسمزی ناشی از NaCl ۳ مولار به مدت یک ساعت و شوک اسمزی ناشی از ۴۰٪ سوربیتول به مدت ۲۴ ساعت. ارتباط میزان مقاومت سویه‌های مخمری به استرس ناشی از NaCl و قند سوربیتول در سطح ۹۹٪ معنی‌دار است. میانگین و انحراف معیار، حاصل سه تکرار غیر وابسته است.

میزان مقاومت سویه‌های صنعتی به شوک حرارتی و میزان تجمع درون سلولی ترهالوز: طبق نتایج حاصل که در شکل ۲ ارائه شده است، بالاترین میزان تجمع درون سلولی ترهالوز به سویه F با میزان ۱۸۶ میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک سلولی مربوط می‌شود. سویه K نیز با مقدار ۱۲۸ میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک حاوی مقادیر بالایی از ترهالوز درون سلولی است. میزان مقاومت سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* در برابر شوک حرارتی در شکل ۳ نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده، بالاترین درصد بقای سلولی پس از اِعمال شوک حرارتی به سویه F با درصد بقای ۶۵ مربوط است این میزان برای سویه‌ی K به ۴۰٪ می‌رسد. نتایج حاصل از آنالیزهای آماری نشان داد که ارتباط میزان مقاومت به شوک حرارتی و میزان تجمع درون سلولی ترهالوز در سویه‌های مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* مورد آزمایش در سطح ۹۹٪ معنی‌دار است ($p<0.01$).



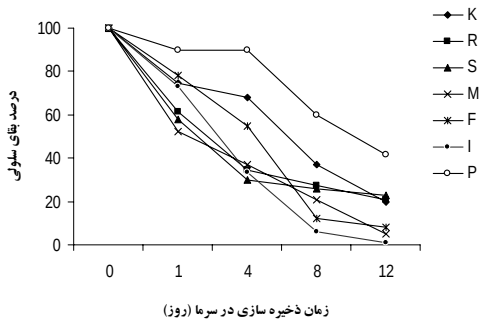
شکل ۲- میزان تجمع درون سلولی ترهالوز در سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* برحسب میلی‌گرم ترهالوز در گرم وزن خشک سلولی. میانگین و انحراف معیار حاصل سه تکرار غیر وابسته است.



شکل۳- درصد بقای سلولی سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* در مواجه با شوک حرارتی ۵۲°C به مدت ۲۰ دقیقه. میانگین و انحراف معیار حاصل سه تکرار غیر وابسته است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-20]

تعیین میزان مقاومت به سرما: نتایج حاصل از قدرت بقای سویه‌های مختلف *ساکارومایسس سرویزیه* در اثر ذخیره‌سازی در سرما (۲۰°C -) در شکل ۴ نشان‌داده شده است. طبق نتایج آماری، ارتباط معنی‌داری بین میزان محتوای درون سلولی ترهالوز یا میزان مقاومت به استرس اسمزی با میزان مقاومت به سرما در این سویه‌ها مشاهده نشد.



شکل۴- درصد بقای سلولی سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* در اثر ذخیره‌سازی به مدت ۱۲ روز در ۲۰°C - . میانگین و انحراف معیار حاصل سه تکرار غیروابسته است.

• بحث

بررسی نتایج آزمایش بقای سلولی سویه‌های مخمری در هنگام مواجه با شوک NaCl نشان داد که میزان مقاومت سویه‌های صنعتی متفاوت است؛ اما سویه‌های صنعتی در مقایسه با سویه P که یک سویه استاندارد آزمایشگاهی است، مقاومت نسبی بالاتری دارند. نکته قابل توجه در این آزمایش، ارتباط بسیار نزدیک میزان مقاومت سویه‌های مخمر به شوک ناشی از قند سوربیتول و شوک حاصل از استرس نمک است. با توجه به داده‌های آماری می‌توان اظهار کرد، سویه‌های مخمری که قدرت بقای بالاتری در مواجه با استرس فشار اسمزی ناشی از قند سوربیتول دارند، به طور حتم قدرت بقای بالاتری در هنگام مواجه با استرس ناشی از NaCl دارند.

با اینکه مکانیسم‌های پاسخ به استرس در مخمر بسیار پیچیده است، اما به نظر می‌رسد که مکانیسم‌های پاسخ به استرس فشار اسمزی ناشی از قند سوربیتول و استرس حاصل از NaCl وجوه اشتراک فراوانی داشته باشند. هنگام مواجه سلول‌های مخمر با استرس ناشی از NaCl ، غلظت داخل سلولی Na^+، K^+ ، گلیسرول و ترهالوز افزایش می‌یابد و هنگام بروز استرس فشار اسمزیِ ناشی از سوربیتول، میزان درون سلولی گلیسرول و ترهالوز افزایش می‌یابد که نشانه ارتباط مکانیسم‌های مقاومت در برابر این دو عامل استرس‌زا در این گونه است (۲۱-۱۹).

یافته‌های آزمایشگاهی این مطالعه نشان داد که همه سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* با وجود متفاوت بودن در میزان مقاومت به فشار اسمزی، قابلیت رشد در پلیت‌های حاوی ۵۰ ٪ قند را دارند. در حقیقت، همه سویه‌های این گونه میکروبی، توانایی رشد در محیط‌هایی با غلظت‌های بیشتر از ۵۰٪ قند را دارند (۲۲). بنابراین، برای جداسازی سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی، محیط‌های حاوی غلظت‌های بالای قند عملا ناکارآمد هستند.

نتایج دیگر نشان داد که غلظت ۰/۵ مولار NaCl در پلیت YPD از رشد برخی سویه‌ها جلوگیری می‌کند (۲۳). با توجه به اثبات ارتباط بسیار نزدیک مکانیسم-های مقاومت به فشار اسمزی ناشی از قندها و NaCl به نظر می‌رسد که NaCl به عنوان یک عامل غربالگر قابلیت بالایی در جداسازی سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی دارد. بنابراین، در جداسازی سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی از نمونه‌های طبیعی یا از سوسپانسیونی که در معرض جهش‌زایی تصادفی قرار گرفته، استفاده از محیط‌های حاوی NaCl بسیار کارآمد است (۲۳). Nishida و همکاران در سال ۲۰۰۴ موفق به جداسازی یک سویه *ساکارومایسس سرویزیه* مقاوم به فشار اسمزی از یک غذای محلی ژاپنی شدند (۲۴) همچنین Osho چندین سویه مقاوم به فشار اسمزی *ساکارومایسس سرویزیه* را از میوه یک گیاه استوایی جداسازی کرد (۲۵) به طور کلی در روش‌های کلاسیک میکروبیولوژی پیشنهاد می‌شود که برای جداسازی یک سویه *ساکارومایسس سرویزیه* مقاوم به فشار اسمزی، نمونه برداری از موادغذایی مثل میوها و غذاهایی انجام گیرد

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-20]

که حاوی مقادیر بالای قند می‌باشند (۲۶، ۲۲) در صورتی که با توجه به نتایج حاضر به نظر می‌رسد، در مواد غذایی که غلظت بالایی از نمک دارند، شانس جداسازی سویه‌های فوق مقاوم به فشار اسمزی بیشتر است و سویه‌های مقاوم به نمک در مقایسه با سویه‌هایی که در حضور مواد قندی زیاد رشد می‌کنند، به مراتب مقاومت بالاتری نسبت به فشار اسمزی دارند.

میزان تجمع درون سلولی ترهالوز به عنوان یک عامل مهم در مقاومت به استرس در سویه‌های مورد آزمایش بررسی شد. ترهالوز یک دی ساکارید غیراحیاء کننده (α-D-glucopyranosyl-1,1-α-D-glucopyranoside) است که به عنوان یک منبع ذخیره‌کننده کربوهیدرات در سلول است. افزایش میزان ترهالوز درون سلول‌های مخمر در بسیاری از شرایط نامساعد رشد (از قبیل دمای بالا، سرما، خشک شدن، گرسنگی، استرس اسمزی، استرس اتانل، استرس اکسیداتیو) و در فاز سکون رشد گزارش شده است (۲۸، ۲۷). تحقیقات متعدد در مورد نقش ترهالوز در افزایش مقاومت سلول‌های مخمری در شرایط بروز استرس انجام گرفته است (۳۰، ۲۹). نقش محافظتی این متابولیت در محافظت سلولی در برابر استرس سرما و حرارت در *ساکارومایسس پومبی* نیز مشاهده شده است (۳۱). نقش ترهالوز در افزایش مقاومت سلول در شرایط استرس به اثر تثبیت کنندگی پروتئین‌ها و تأثیر این ملکول در یکپارچه نگه داشتن غشای سلولی نسبت داده می‌شود (۳۲). در نتایج حاصل از آزمایش‌های این مطالعه بیشترین میزان ترهالوز مربوط به سویه F بود. همچنین سویه K میزان بالایی از تجمع درون سلولی ترهالوز را نشان داد. میزان مقاومت سلولی در برابر استرس شوک حرارتی در سویه‌ها نیز بررسی شد. ارتباط بسیار نزدیکی بین میزان تجمع درون سلولی ترهالوز و درصد بقای سلولی در هنگام بروز استرس شوک حرارتی مشاهده شد. طبق نتایج این مطالعه، نقش ترهالوز در محافظت سلول‌ها در برابر شوک حرارتی تایید می‌شود که با یافته‌های قبلی مطابقت دارد(۳۲، ۳۱).

طبق نتایج مطالعه حاضر، همبستگی میزان درون سلولی ترهالوز و قدرت بقا در برابر شوک سرما معنی‌دار نبود. همچنین، ارتباط معنی‌دار ضعیفی بین میزان تجمع درون سلولی ترهالوز و قدرت بقای سلولی در هنگام بروز استرس اسمزی ناشی از سوربیتول و NaCl در بین سویه‌های مورد آزمایش وجود داشت. هرچند افزایش سنتز و تجمع درون سلولی ترهالوز هنگام بروز این استرس‌ها در سلول‌های *ساکارومایسس سرویزیه* گزارش شده، اما طبق جستجوهای مطالعه حاضر، هیچ گزارشی مبنی بر ارتباط بین درصد بقای سلولی در هنگام بروز استرس اسمزی و NaCl با میزان تجمع درون سلولی ترهالوز در بین سویه‌های مختلف *ساکارومایسس سرویزیه* گزارش نشده است. با توجه به نتایج حاصل از آزمایش‌های این تحقیق و مطالعات صورت گرفته در این زمینه به طور صریح می‌توان اظهار داشت اگرچه افزایش میزان تجمع درون سلولی ترهالوز در یک سویه *ساکارومایسس سرویزیه* منجر به افزایش قدرت بقای سلولی آن سویه در هنگام استرس ناشی از سوربیتول و NaCl می‌شود، اما عوامل متعدد دیگری در میزان مقاومت به فشار اسمزی و شوک حاصل از NaCl تأثیرگذار هستند که عامل ترهالوز را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بنابراین، به دلیل نقش مهم عوامل مقاومتی دیگر در هنگام بروز استرس اسمزی، تنها با استناد به بالاتر بودن میزان تجمع درون سلولی ترهالوز در یک سویه *ساکارومایسس سرویزیه* نمی‌توان آن سویه را نسبت به فشار اسمزی مقاوم‌تر از سویه‌های دیگری دانست که محتوای ترهالوز کمتری دارند. اما شواهد حاصل از آزمایشات مطالعه حاضر بیانگر این نکته است که اگر سویه‌ای از *ساکارومایسس سرویزیه* میزان تجمع درون سلولی بالاتری نسبت به سویه‌های دیگر داشته باشد، بدون در نظر گرفتن دیگر خصوصیات آن سویه به طور قطع از میزان مقاومت به شوک حرارتی بالاتری نیز برخوردار است. در واقع اگرچه عوامل متعددی در مقاومت سلول‌های مخمری به شوک حرارتی تأثیر گذار هستند، اما نقش ترهالوز به اندازه‌ای مهم است که بقیه عوامل ایجاد کننده مقاومت به شوک حرارتی را

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-20]

تحت‌الشعاع قرار می‌دهد. همبستگی شدید میزان ترهالوز و مقاومت به شوک حرارتی از نظر کاربردی حائز اهمیت است. جداسازی سلول‌هایی که محتوای ترهالوز درون سلولی بالاتری دارند، با تیمار حرارتی بسیار ساده‌تر از بررسی تک تک سلول‌های مورد آزمایش است. تیمار حرارتی به عنوان یک عامل غربال‌گر منجر به حذف سلول‌هایی می‌شود که محتوای ترهالوز پایین‌تری دارند. Jin و همکاران در سال ۲۰۰۵ با به‌کارگیری عامل جهش‌زای UV و متعاقب آن به‌کارگیری عامل غربال‌گر حرارتی موفق به جهش‌زایی تصادفی و جداسازی یک سویه مقاوم به حرارت شدند. جالب اینکه این روش به منظور جداسازی سویه‌های تولید کننده‌ی بیواتانل بالاتر به کار گرفته شده بود (۳۱). احتمالاً Jin و همکاران در آزمایشات خود به رابطه مستقیم میزان مقاومت به شوک حرارتی و تولید بیواتانول دست یافته بودند و از عامل غربال‌گر حرارتی به منظور جداسازی سویه‌های بهینه‌ی مولد بیواتانل استفاده کردند. در آزمایش Jin برای شناسایی سویه‌های تولیدکننده بیواتانل بالاتر نیاز به بررسی تک تک سلول‌های جهش‌یافته است که در این‌صورت تعداد محدودی از سلول‌ها قابل بررسی هستند؛ در صورتی که با اعمال شوک حرارتی چند سلول بهینه از میان سوسپانسیون حاوی میلیون‌ها سلول ناخواسته جداسازی می‌شود.

یکی از روش‌های کاربردی بهینه‌سازی سویه‌های صنعتی، جهش‌زایی و جداسازی سلول‌های جهش‌یافته بهینه است که در این روش کلاسیک، مرحله غربال‌گری با آزمایش روی تک تک سلول‌ها انجام می‌شود. این مرحله، بسیار پرهزینه و زمان‌بر است و در صورتی که بتوان ارتباطی میان یک عامل استرس‌زا و صفت صنعتی مطلوب در گونه مورد مطالعه شناسایی کرد، قابلیت جداسازی سویه‌های بهینه پس از جهش‌زایی تسهیل شده و هدفمند می‌شود.

سپاسگزاری

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری و مدیریت *تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان* به دلیل حمایت از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

• References

1. Maloney DH, Foy JJ. Yeast Fermentations. In: Klup K, Lorenz K, editors. Handbook of dough fermentations. New York: Marcel Dekker Inc; 2003: 41-60.

2. Mobini DM, Nahvi I, Zarkesh EH, Ghaedi K, Tavassoli M. Akada R. Isolation of a novel mutant strain of *saccharomyces cerevisiae* by and ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. J Biosci Bioengin 2008; 105: 403- 408.

3. Teunissen A, Dumortier F, Gorwa MF, Bauer J, Tanghe A, Loïez A, et al. Isolation and characterization of a freeze-tolerant diploid derivative of an industrial baker's yeast strain and its use in frozen doughs. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 4780- 4787.

4. Colaco CALS, Smith CJS, Sen S, Roser DH, Newman Y, Ring S, et al. Chemistry of protein stabilization by trehalose. In: Cleland JL, Langer R, editors. Formulation and delivery of proteins and peptides. Washington DC: American Chemical Society; 1994: 222-240.

5. Higgins VJ, Alic N, Thorpe GW, Breitenbach M, Larsson V. Phenotypic analysis of gene deletant strains for sensitivity to oxidative stress. Yeast 2002; 19: 203-214.

6. Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns J, Kivinen K, et al. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular Biology of the Cell* 2003; 14: 214-229.

7. Ando M, Nakamura S, Shinomiya Y. inventors. Sugar super tolerant yeast for confectionary and bakery. US patent; 6,521,272 B1. 2003.

8. Donalies UEB, Nauyen HTT, Stahl U, Nevogt E. Improvement of *Saccharomyces* yeast strains used in brewing, wine making and baking. In: Scheper T, editor. Food biotechnology. Berlin: Springer; 2008: 67-99.

9. Bell PJL, Higgins VJ, Attfield PV. Comparison of fermentative capacities of industrial baking and wild-type yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* in different sugar media. Lett Appl Microbiolo. 2001; 32: 224-229.

10. Pataro C, Guerra JB, Gomes FC, Neves MJ, Pimentel PF, Rosa CA. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-20]

isolated from 24 h fermentative cycles during production of artisanal brazilian cachaca. Brazilian J Microbiol 2002; 33: 202-208.

11. Sree KN, Sridhar M, Suresh K, Banat IM, Rao V. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Bioresour technol 2000; 72: 43-46.

12. Bechem EET, Omoloko O, Nwaga D, Titanji VPK. Characterization of palm wine yeasts using osmotic, ethanol tolerance and the isozyme polymorphisms of alcohol dehydrogenase. Afr J biotechnolo 2007; 6(14): 1715-1719.

13. Ian WD. Stress responces. In: Diskson RJ, Schweizer M, editors. The metabolism and molecular physiology of *saccharomyces cerevisiae*. 2nd ed. Washington DC: CRC Press 2004. 376-421.

14. Hounsa C, Brandt EV, Thevelein JM, Hohman S, Prior BA. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. Microbiol 1998; 144: 671-680.

15. Attfield PV. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. Nature Biotechnol 1997; 15: 1351-1357.

16. Pratt PL, Bryce JH. Stewart GC. The effect of Osmotic pressure and ethanol on yeast Viability and morphology. J Institute of Brewing 2003; 109: 218-228.

17. Van-Dijck P, Colavizza D, Smet P, Thevelein JM. Differential Importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *saccharomyces cerevisiae* cells. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 109-115.

18. Trevelyan W E, Harrison JS. Studies on yeast metabolism: The trehalose content of baker yeast durin-g anaerobic fermentation. Biochem J 1956; 62: 177-183.

19. Jennings DH, editor. The physiology of fungal nutrition. Cambridge: Cambridge University Press 1995. p. 640.

20. Carvalheiro F, Roseiro CJ, Girio FM. Interactive effects of sodium chloride and heat shock on trehalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces Cerevisiae*. Food Microbiol 1999; 16: 543-550.

21. Modig T, Granath K, Adler L, Liden G. Anaerobic glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae* strains under hyperosmotic stress. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 75: 289-296.

22. Kurtzman CP, fell JW, editors. The yeasts A Taxonomic study. 4th ed. New York: Elsevier 2000. p. 1055.

23. Golabi M. Isolation and characterization of resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic pressure and freezing [dissertation]. Esfahan: Esfahan University. Faculty of Science; 2008. [in Persian]

24. Nishida O, Kuwasaki S, Suzuki C, Shima J. Superior molasses assimilation, stress tolerance and trehalose accumulation of bakers yeast isolated from dried sweet potatoes. Bioscie Biotechnol Biochem 2004; 68: 1442-1448.

25. Osho A. Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. Afr J Biotechnolo 2005; 4(7): 660-662.

26. Nwachukwa IN, Ibekwe VI, Nwabueze RN, Anyanwu BN. Characterization of palm wine yeast isolates for industrial utilization. Afr J Biotechnol 2006; 5(19): 1725-1728.

27. Lewis JG, Learmonth RP, Watson K. Role of growth phase and ethanol in freeze-thaw stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol 1993; 59: 1065-1071.

28. Hounsa C, Brandt EV, Thevelein JM, Hohman S, Prior BA. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. Microbiol 1998; 144: 671-680.

29. Owobi LP, Durner S, Goma G, Francois J. Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability. International J Food Microbiol 2000; 55: 33-40.

30. Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. J Biological Chem 2001; 29: 24261-24267.

31. Jin C, Hon NWX, Pan J, Zeng Y, Zhu M. Isolation and characterization of a highly thermotolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Ann Microbiol 2005; 55: 57-61.

32. De Virgillio C, Hottiger T, Dominguez J, Boller T, Wiemkem A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast: genetic evidence trehalose is a thermo-protectant. Euro J Biochem . 1994; 219: 179- 186.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-20]