

تهیه وانیلین طبیعی از ایزاواوژنول به وسیله یک فرایند زیست تبدیلی میکروبی

مراحم آشنگرف^۱، ایرج نحوی^۲، سید حمید زرکش اصفهانی^۳

۱- نویسنده مسئول: دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان پست الکترونیکی: Ashengraph@sci.ui.ac.ir

۲- استاد گروه زیست شناسی، دانشگاه اعلوم، دانشگاه اصفهان

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه اعلوم، دانشگاه اصفهان

تاریخ پذیرش: ۱۵/۱۱/۸۸

تاریخ دریافت: ۵/۹/۸۸

چکیده

سابقه و هدف: دو روش عمده دستیابی به وانیلین طبیعی شامل استخراج مستقیم از منابع گیاهی و زیست تبدیلی میکروبی است. با توجه به کاربرد گسترده وانیلین و افزایش روزافزون تقاضا برای مصرف وانیلین طبیعی و همچنین از آنجا که استخراج از منابع گیاهی بسیار پرهزینه و زمان بر است و به تنها یابازارهای جهانی نیست، توسعه فرایندهای جایگزین مناسب الزامی است. در این پژوهش، که برای اولین بار در ایران انجام شده، کاربرد زیست تبدیلی میکروبی در ایجاد وانیلین طبیعی از ایزاواوژنول بررسی شد.

مواد و روش‌ها: میزان تحمل پذیری سویه‌های باکتریایی جدا شده به ایزاواوژنول و وانیلین، به روش رقت در آگار تعیین شد. غربال‌گری اولیه سویه‌های باکتریایی با قابلیت تبدیل ایزاواوژنول به وانیلین از طریق TLC انجام شد و وانیلین حاصل به روش AOAC مورد سنجش قرار گرفت. وانیلین تهیه شده از این روش با وانیلین استاندارد طی دو روش UV و TLC مورد شناسایی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیشترین غلظت وانیلین تولید شده ۸۸۰ میلی گرم در لیتر (rpm ۱۵۰ در دمای ۳۰°C) توسط سویه KOA1 پس از ۹۶ ساعت واکنش زیست تبدیلی به دست آمد. در این تحقیق راندمان مولی تهیه وانیلین طبیعی از ایزاواوژنول ۹/۵ درصد بود.

نتیجه‌گیری: جداسازی سویه‌های تولید کننده وانیلین از منابع طبیعی و شناسایی اولیه این سویه‌ها، گام نخست در انتخاب سویه‌های برتر برای تولید میکروبی وانیلین از ایزاواوژنول است.

وازگان کلیدی: ایزاواوژنول، زیست تبدیلی میکروبی، وانیلین

۰ مقدمه

استفاده می‌شود(۲). وانیلین در سال ۱۸۵۹ برای اولین بار توسط Gobley از عصاره الکلی دانه وانیل استخراج شد. در سال ۱۸۷۲ Carles موفق شد تا فرمول بسته این ترکیب را به دست آورد و در سال ۱۸۷۴ ساختمان آن توسط Tiemann و Harman تعیین شد. در همان سال، وانیلین توسط Riemer و Riener به صورت صنعتی سنتز شد (۳، ۴).

در حال حاضر، مصرف جهانی وانیلین بیش از ۳۰۰۰۰ تن در سال است که ارزش خالص آن معادل ۲ میلیارد دلار است. دو نوع تجارتی از وانیلین در بازارهای جهانی موجود است: وانیلین شیمیایی که عمدها از پیش‌سازهای لیگنینی و گایاکول سنتز می‌شود و قیمت تمام شده آن حدود ۱۵ دلار به ازای هر کیلوگرم است (۵) و دیگری وانیلین طبیعی که از طریق استخراج الکلی از دانه‌های گیاه *Vanilla planifolia*

امروزه، زیست واکنش‌گرهای میکروبی به طور روزمره در صنایع غذایی و به طور فرایندهای در صنایع داروسازی و شیمیایی برای سنتز مواد شیمیایی خاص و با ارزش با پتانسیل صنعتی شدن به کار می‌روند. از فراورده‌های با ارزش تولیدی از طریق زیست واکنش‌گرهای میکروبی می‌توان به انواع ترکیبات استرتوئیدی، پروستاگلاندین‌ها، انواع آنتی‌بیوتیک‌های خاص، نگهدارنده‌های غذایی و انواع ترکیبات معطر اشاره کرد. وانیلین یا ۴-هیدروکسی-۳-متوكسی بنزالدئید با فرمول بسته $C_8H_8O_3$ از مهم‌ترین ترکیبات معطر آروماتیک استفاده شده در صنایع غذایی، آرایشی، بهداشتی، پزشکی و دارویی است (۱). از وانیلین در صنایع مختلف غذایی به عنوان طعم دهنده و همچنین با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن به عنوان نگهدارنده

اکسید شدن وانیلین به وانیلیک اسید یا احیا به وانیلیل الكل توسط میکرووارگانیسم، پایین است (۲۰). در اولین گزارش منتشر شده، غلظت و راندمان مولی وانیلین ایجاد شده از *Aspergillus niger* ایزواوژنول به وسیله سویه خاصی از قارچ به ترتیب ۰/۰۸ گرم در لیتر و ۱۰٪ بوده است (۲۱). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۰ توسط *Shimoni* و همکاران انجام شده، غلظت و راندمان مولی وانیلین تولید شده از *Bacillus subtilis* strain B2 به ترتیب ۰/۶۱ گرم در لیتر و ۱۲/۴٪ گزارش شده است (۱۵). در یکی از جدیدترین مطالعات سال ۲۰۰۷ توسط *Kasana* و همکاران غلظت و راندمان مولی وانیلین تهیه شده از ایزاوژنول در سویه خاصی از *Pseudomonas cholororaphis* به ترتیب ۱/۲ گرم در لیتر و ۱۲/۶٪ گزارش داده شده است (۱۶). اگرچه در بیشتر مطالعات صورت پذیرفته، راندمان تولید وانیلین از ایزاوژنول نسبتاً پایین بوده؛ ولی با این حال با توجه به ارزان بودن و در دسترس بودن، همچنان ایزاوژنول به عنوان سوبسترای پیش‌ساز برای تولید وانیلین پیشنهاد می‌شود. در این پژوهش که برای اولین بار در ایران صورت می‌گیرد، تولید وانیلین از ایزاوژنول به وسیله سویه‌های باکتری بومی جدا شده، مورد مطالعه قرار گرفته است.

• مواد و روش‌ها

مواد و دستگاه‌ها: مواد شامل ایزاوژنول ۹۸٪ (مخاوط سیس-ترانس) و وانیلین ۹۹٪ از شرکت سیگما خریداری شد (St.Louis,Mo). صفحات TLC (thin layer chromatography) (آلومینیومی با فاز ثابت سیلیکازل 60F254)، n-هگزان، اتیل استات، اسید کلریدریک، اسید سولفوریک، دی اتیل اتر، محلول بی سولفیت سدیم اشباع و اتانول ۹۹٪ از شرکت مرک آلمان تهیه شد. سایر مواد شیمیایی استفاده شده با درجه خلوص بالا بودند.

Dستگاه‌ها عبارت بودند از: UV-vis Spectrophotometer (SPECORD S10)، هیتر استیر (هیدوف، آلمان)، Transilluminator (Heidolph، Germany) evaporator orbital (UVp, TS-36, U.S.A)، اتوکلاو، شیکر دورانی (incubator S150، Stuart Scientific)، و لوازم معمولی آزمایشگاهی.

تهیه می‌شود و قیمت تمام شده آن حدود ۱۲۰۰ تا ۴۰۰۰ دلار به ازای هر کیلوگرم است (تقرباً ۲۵۰ بار گران‌تر از وانیلین سنتیک) (۷). دلایل بالا بودن قیمت تمام شده وانیلین طبیعی عمدها به سبب شرایط آب و هوایی، پیچیدگی شرایط کشت، طولانی بودن زمان پروسه و سختی مراحل استخراج است. با وجود افزایش تقاضای روزافزون برای مصرف عصاره وانیل طبیعی، با توجه به نرخ بسیار بالای آن و همچنین خلوص پایین محصول تولیدی، توسعه فرایندهای جایگزین مناسب الزامی به نظر می‌رسد (۸). در حال حاضر، مهم‌ترین فرایند بیوتکنولوژی برای تهیه وانیلین طبیعی و سایر متوكسی فنلهای با ارزش، زیست تبدیلی میکروبی است.

منظور از زیست تبدیلی میکروبی، استفاده از میکرووارگانیسم‌ها به عنوان زیست واکنش‌گر برای تبدیل پیش‌سازهای طبیعی به ترکیبات طبیعی با ساختار مشابه اما با ارزش افزوده بسیار بالاتر است. تبدیل پیش‌سازهای طبیعی مانند فرولیک اسید (۱۱-۹)، وانیلیک اسید (۱۲)، اوزنول (۱۳) و ایزاوژنول (۱۷-۱۴) به وانیلین با استفاده از میکرووارگانیسم‌های مختلف به عنوان زیست واکنش‌گر به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است. از بین پیش‌سازهای طبیعی به کار رفته برای تولید وانیلین طبیعی تا به امروز بیشترین بازده تولیدی (بیش از ۱۰ گرم در لیتر) برای فرولیک اسید گزارش شده است (۱۸، ۱۹) با توجه به اینکه فرولیک اسید طبیعی، بسیار گران قیمت است و دسترسی کافی به آن وجود ندارد. در سال‌های اخیر بیشتر مطالعات روی استفاده از پیش‌سازهای ارزان قیمت مانند اوزنول و ایزاوژنول متمرکز شده است. فنیل پروپانوئیدهای لیگنینی مانند اوزنول و ایزاوژنول که به مقادیر فراوان در روغن‌های گیاهی به ویژه روغن میخک (Clove oil) یافت می‌شوند، به عنوان سوبستراهای ارزان قیمت طبیعی برای دگرگون سازی میکروبی از پتانسیل بسیار بالایی برخوردار هستند. برخی میکرووارگانیسم‌ها مانند: *Aspergillus niger*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus subtilis*, *Serattia* و *Pseudomonas putida* و *Rhodopoccus rhodocourous* می‌توانند ایزاوژنول را به *Pseudomonas cholororaphis* وانیلین تبدیل کنند (۱۶، ۱). با توجه به اینکه وانیلین به عنوان یک حد واسط اصلی در مسیر تجزیه ایزاوژنول ایجاد می‌شود، تحقیقات گسترده‌ای در ارتباط با تهیه وانیلین از ایزاوژنول صورت پذیرفته است. راندمان تولید وانیلین در اثر

غربال‌گری اولیه سویه‌های تبدیل کننده ایزاواژنول به وانیلین: سویه‌های باکتری در یک محیط بیوتانسفسورماسیون طراحی شده (GY) به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس ایزاواژنول در غلظت ۱٪ (حجمی/حجمی) به محیط افزوده شد. ترکیب محیط به صورت زیر بود (درصد وزنی/حجمی):

Glucose ·۰·۵، Yeast extract ·۰·۵، $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ·۰·۲، $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ·۰·۲، KH_2PO_4 ·۰·۳، $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ·۰·۱۵، $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ·۰·۵

بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری اضافی ابتدا کل سوپرناتانت را جدا کرده، به وسیله اسید سولفوریک ۱۰ نرمال به دقت اسیدی شده تا وانیلین به شکل آزاد خود درآید. سپس هم حجم آن کلروفرم اضافه شد. فاز کلروفرمی از فاز آبی به وسیله قیف جدا کننده جدا شد. محلول‌های کلروفرم جمع آوری شده توسط دستگاه روتاری تبخیر شد. جسم روغنی جدا شده در ته بالن در کلروفرم تغليظ شد و با استفاده از فاز متحرک هگران: اتیل استات (به نسبت ۳ به ۴) مورد آنالیز TLC قرار گرفت.

زیست تبدیلی ایزاواژنول به وانیلین به وسیله کشت رویشی سویه KOA1: سویه KOA1 که براساس آنالیز TLC بیشترین تولید وانیلین را داشت، در محیط بیوتانسفسورماسیون طراحی شده (GY) در 30°C و 150 rpm به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شد و سپس 150 rpm به مدت 2 hr در غلظت 2% (حجمی/حجمی) به محیط اضافه شد. نمونه‌ها در فواصل زمانی مختلف برداشت و سانتریفیوژ شد (3500 rpm به مدت 30 دقیقه). سپس از مایع رویی برای تعیین غلظت وانیلین تشکیل شده در مخلوط واکنش راکشن از طریق استخراج با محلول بی‌سولفیت سدیم اشباع و تعیین غلظت آن به وسیله روش AOAC (۲۳) با اندازه‌گیری، استفاده شد.

تعیین غلظت وانیلین تشکیل شده در مخلوط واکنش: برای تعیین غلظت وانیلین تشکیل شده در محیط کشت سویه KOA1 با استفاده از محلول بی‌سولفیت سدیم اشباع وانیلین تشکیل شده استخراج شد و سپس غلظت آن از طریق روش پیشنهادی AOAC تخمین زده شد. برای این منظور ابتدا باکتری روی محیط نوترینت آگار کشت داده شده و در دمای 30°C به مدت 18 تا 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس سوسپانسیونی از کشت 24 ساعته با کدورتی معادل 5% مک فارلن (میکروب تلقیح شده $10^8 \times 1/5$ cfu/ml) تهیه

سویه‌ها و شرایط کشت: 24 سویه باکتری از خاک‌های جمع‌آوری شده از مزارع، باغچه‌ها و گلخانه‌های مناطق مختلف در ایران جدا شد (خاک‌های ریحان، میخک، گیاهان دارویی و انواع مختلفی از گیاهان معطر)، این نمونه‌ها از اصفهان، یزد و کردستان جمع‌آوری شده بودند. جهت غنی سازی و جداسازی سویه‌های باکتری مختلف از محیط پایه نمکی با ترکیب زیر استفاده شد (درصد وزنی/حجمی): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ·۰·۲، $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ·۰·۰۵، $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ·۰·۰۵، $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ·۰·۰۲۵، KH_2PO_4 ·۰·۳، $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ·۰·۱۵

در موارد لزوم برای جامد کردن محیط کشت به آن 2% آگار اضافه شد. pH محیط کشت قبل از اتوکلاو کردن با هیدروکسید سدیم یک نرمال به حدود 7 رسانده شد. پس از اتوکلاو کردن، غلظت مشخصی از ایزاواژنول (10 mg/L) درصد حجمی/حجمی) به عنوان تنها منبع کربن و انرژی، پس از استریل کردن از طریق پالایه‌های غشایی (میلی پور) با قطر سوراخ $22\text{ }\mu\text{m}$ میکرونی به آن اضافه شد.

غربال‌گری سویه‌های با قابلیت تحمل پذیری غلظت‌های بالای ایزاواژنول و وانیلین: برای تعیین میزان تحمل پذیری سویه‌های جدا شده نسبت به ایزاواژنول و وانیلین از روش رقت در آگار استفاده شد (۲۲). به ارلن‌های 100 ml میلی‌لیتری حاوی 20 ml ازنوتربینت آگار ذوب شده، تراکم خاصی از ایزاواژنول و وانیلین اضافه شد و سپس داخل پلیت‌های شیشه‌ای به قطر 8 cm ریخته شد. محلول‌های استوک ایزاواژنول و وانیلین در دی متیل فرمامید (DMF) تهیه شد و با پالایش از طریق پالایه‌های غشایی (میلی پور) با قطر سوراخ $22\text{ }\mu\text{m}$ میکرونی استریل شد. میزان تراکم استفاده شده برای ایزاواژنول و وانیلین بر حسب میلی‌مolar به ترتیب عبارت بود از: $5\text{, }10\text{, }15\text{, }20\text{, }25\text{, }30\text{, }35\text{, }40\text{, }45\text{, }50\text{, }55\text{, }60\text{, }65\text{, }70\text{, }75$ و $80\text{ }\mu\text{g/ml}$ برای ایزاواژنول و $1\text{, }5\text{, }10\text{, }20\text{, }25\text{, }30\text{, }35\text{, }40\text{, }45\text{, }50\text{, }55\text{, }60\text{, }65\text{, }70\text{, }75$ و $80\text{ }\mu\text{g/ml}$ برای وانیلین. پلیت‌های آگاردار در دمای 40°C به مدت 30 دقیقه قرار گرفتند تا سطح مرطوب آنها خشک شود و سپس به وسیله سمپلر 10 ml میکرولیتر از محیط مایع که میکروب مورد نظر در آن رشد کرده بود (رشد لگاریتمی) و تراکم آن 0.5 mg/ml مک فارلن بود روی محیط آگاردار قرار گرفت (میکروب تلقیح شده $10^8 \times 1/5$ cfu/ml). پلیت‌ها پس از گرمخانه‌گذاری در 30°C در ساعت‌های $24\text{, }48\text{, }72$ و 120 h مورد مطالعه قرار گرفتند.

باکتریایی، شناسایی باکتری‌های تحمل پذیر به غلظت‌های بالای ایزواوژنول و وانیلین، قدم اول در جهت انتخاب سویه‌هایی است که قادر به تجزیه ایزواوژنول و تبدیل آن به وانیلین هستند و می‌توانند در انتخاب سویه برتر جهت بیوتانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین مفید باشند(۲۲). در این راستا ۲۴ سویه باکتری از خاک‌های مناطق مختلف ایران بر اساس تکنیک غنی سازی جدا شدند. تحمل پذیری ذاتی این سویه‌ها نسبت به ایزواوژنول و وانیلین به وسیله روش رقت در آگار تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱- الگوی تحمل پذیری به ایزواوژنول و وانیلین (بر حسب میلی مولار) در سویه‌های باکتریایی جدا شده از خاک‌های مناطق مختلف ایران

سویه باکتری	ایزواوژنول (C ₁₀ H ₁₂ O ₂)	وانیلین (C ₈ H ₈ O ₃)
KOA1	>۸۰	>۴۰
KOA18	۷۵	۳۵
IMPA21	۷۰	۳۵
IDA16	۶۵	۳۰
سایر سویه	<۵۵	<۲۵

از بین ۲۴ سویه باکتری جدا شده، ۴ سویه باکتری (KOA18، KOA1، IMPA21 و IDA16) که بالاترین تحمل پذیری را نسبت به ایزواوژنول و وانیلین از خود نشان دادند (بالاتر از ۱۰ g/1 برای ایزواوژنول و ۱ g/1 برای وانیلین) انتخاب شدند و جهت سنجش قابلیت تبدیل ایزواوژنول به وانیلین مورد آنالیز TLC قرار گرفتند (شکل ۱). همان گونه که در شکل نشان داده شده، سویه ۱ KOA1 (Lane A) که در شکل نشان داده شده، سویه ۱ KOA1 (Lane A) بیشترین مقدار وانیلین را تولید کرده است. این سویه از خاک جمع آوری شده از مزارع کشت ریحان در کردستان جدا شد. سویه ۱ KOA1 یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، غیر اسپوردار، متحرک و تولید کننده کاتالاز و اکسیداز بود. براساس مطالعات فنوتیپی، فیزیولوژیکی و تست‌های بیوشیمیای متعدد و همچنین مطالعه ویژگی‌های این باکتری با سایر باکتری‌های شناخته شده می‌توان به طور موقع سویه ۱ KOA1 را در جنس *Pseudomonas* طبقه‌بندی کرد (داده‌ها نشان داده نشده است).

کرده و ۵ ml./به محیط بیوتانسفورماسیون طراحی شده (GY) حاوی غلظت‌های مختلف از ایزواوژنول (۲۵ ml در ارلن‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری) تلقیح شده و در دمای ۳۰ °C در شیکر چرخشی (۱۵۰ rpm) به مدت ۱۲۰ ساعت گرمانه‌گذاری شد.

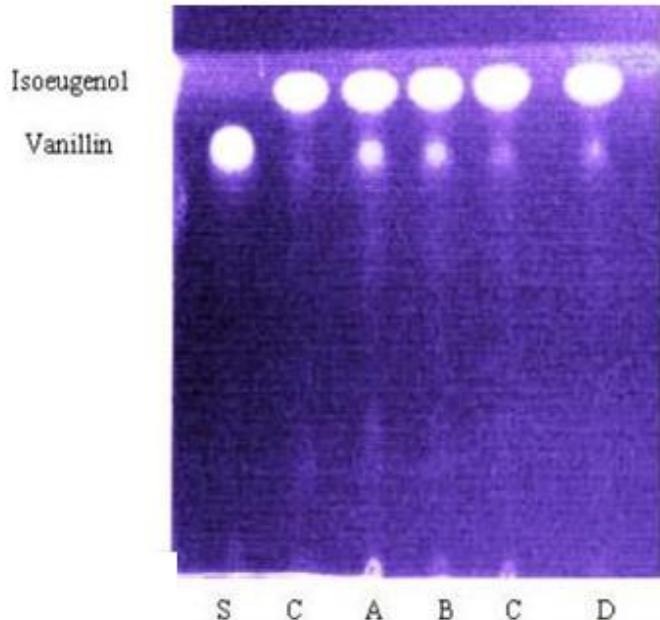
در فواصل زمانی مشخص، مایع رویی را جدا کرده، ابتدا به وسیله محلول اسید سولفوریک ۱۰ نرمال به دقت اسیدی کرده سپس هم حجم آن کلروفرم اضافه شد. فاز کلروفرمی افزار آبی به وسیله قیف جدا کننده جدا شد. فاز آبی دوباره به وسیله کلروفرم شست و شو داده شد. این عمل ۵ بار تکرار شد. به محلول کلروفرم جمع آوری شده، به میزان ۲/۵ برابر حجم آن، محلول بی سولفات سدیم اشباع افزوده شد. سپس مخلوط حاصله در یک بالن ریخته شد و درون آن همزن مغناطیسی انداخته شد. پس از ۳۰ دقیقه فاز کلروفرمی به وسیله قیف جدا کننده از فاز آبی جدا شد. فاز آبی دوباره به وسیله کلروفرم شست و شو داده شد. این عمل ۳ بار تکرار شد. سپس زیر هود به میزان حدود یک پنجم فاز آبی، محلول اسید سولفوریک ۵۰٪ اضافه شد. محلول حاصله درون حمام آب قرار گرفت تا حباب‌های گاز SO₂ خارج شوند. در این حالت، وانیلین به شکل آزاد خود وارد فاز آبی شد و سپس وانیلین موجود در فاز آبی به وسیله اتر استخراج شد. پس از تبخیر اتر، وانیلین استخراجی در اتانول ۵٪ حل شده و سپس بر اساس روش پیشنهادی AOAC مبنی بر هیدرولیز وانیلین با NaOH (۱٪ نرمال) و اندازه‌گیری جذب آن در ۳۴۸ نانومتر، ابتدا منحنی جذب استاندارد ترسیم شد و سپس از روی معادله خط به دست آمده، غلظت وانیلین در مخلوط واکنش تخمین زده شد (۲۳).

شناسایی وانیلین: جهت شناسایی وانیلین از روش در حضور وانیلین استاندارد و فاز متحرک n-هگزان: اتیل استات (به نسبت ۳ به ۴) و همچنین از طریق مقایسه طیف فرابنفش (UV) وانیلین استخراجی سنتز شده با طیف فرابنفش وانیلین استاندارد استفاده شد.

• یافته‌ها

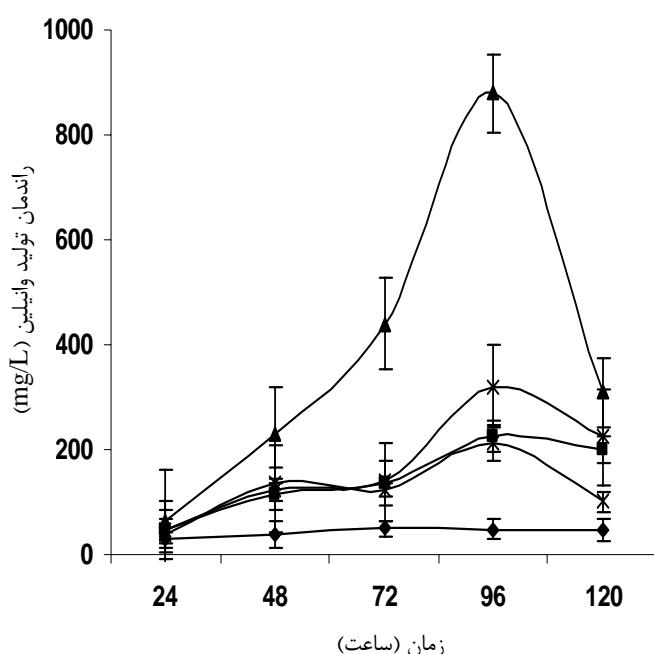
جداسازی سویه‌های باکتری دارای تحمل پذیری بالا با قابلیت تبدیل ایزواوژنول به وانیلین: با توجه به سمیت سوبسترا (ایزواوژنول) و محصول (وانیلین) روی سلول‌های

شناسایی وانیلین: برای اثبات وجود وانیلین در مخلوط واکنش بیوتانسفورماسیون، ابتدا باند وانیلین استخراجی سنتز شده با وانیلین استاندارد در TLC مقایسه شد که وجود R_f یکسان ($R_f = 0.74$) مربوط به وانیلین استاندارد (a) و وانیلین سنتزی از ایزاواوژنول (b) بیانگر حصول وانیلین از ایزاواوژنول است (شکل ۳ قسمت A)، سپس طیف فرابنفش (UV) وانیلین استخراجی سنتز شده با طیف فرابنفش وانیلین استاندارد در دامنه ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis گرفته شد (شکل ۳ قسمت‌های C، B). همان‌گونه که در شکل نشان داده شده، وجود منحنی‌های مشابه بیانگر حصول وانیلین از ایزاواوژنول است.



شکل ۱- بیوتانسفورماسیون ایزاواوژنول به وانیلین

S: وانیلین استاندارد، C: محیط کنترل (حاوی ایزاواوژنول و بدون تلقیح باکتری)، KOA1، B: سویه KOA18، C: سویه IMPA21، D: سویه IDA16



شکل ۲- اثر غلظت‌های اولیه ایزاواوژنول و زمان انکوباسیون روی بیوتانسفورماسیون ایزاواوژنول به وانیلین در سویه باکتری KOA1 در محیط پایه GY. غلظت‌های ایزاواوژنول (درصد حجمی/حجمی): (◆) ۰/۱، (■) ۰/۵، (▲) ۰/۰، (＊) ۱/۵، (※) ۱/۰. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش و بار معرف ۱± انحراف معیار است.

بیوتانسفورماسیون ایزاواوژنول به وانیلین به وسیله سویه KOA1: توانایی ایجاد وانیلین از ایزاواوژنول در سویه KOA1، با اضافه کردن ایزاواوژنول به کشتی از سویه KOA1 که روی محیط حاوی گلوکز رشد داده شده، مورد سنجش قرار گرفت. برای این منظور ابتدا سلول‌های باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت روی محیط طراحی شده (GY) حاوی ۰/۵٪ گلوکز رشد داده شده و سپس ایزاواوژنول در غلظت‌های مختلف (۰/۱٪ تا ۲٪ حجمی/حجمی) به کشت باکتریایی افزوده شد. میزان وانیلین تولیدی از ایزاواوژنول به وسیله سویه KOA1 با استفاده از روش معرفی شده در بخش مواد و روشها مورد سنجش قرار گرفته است.

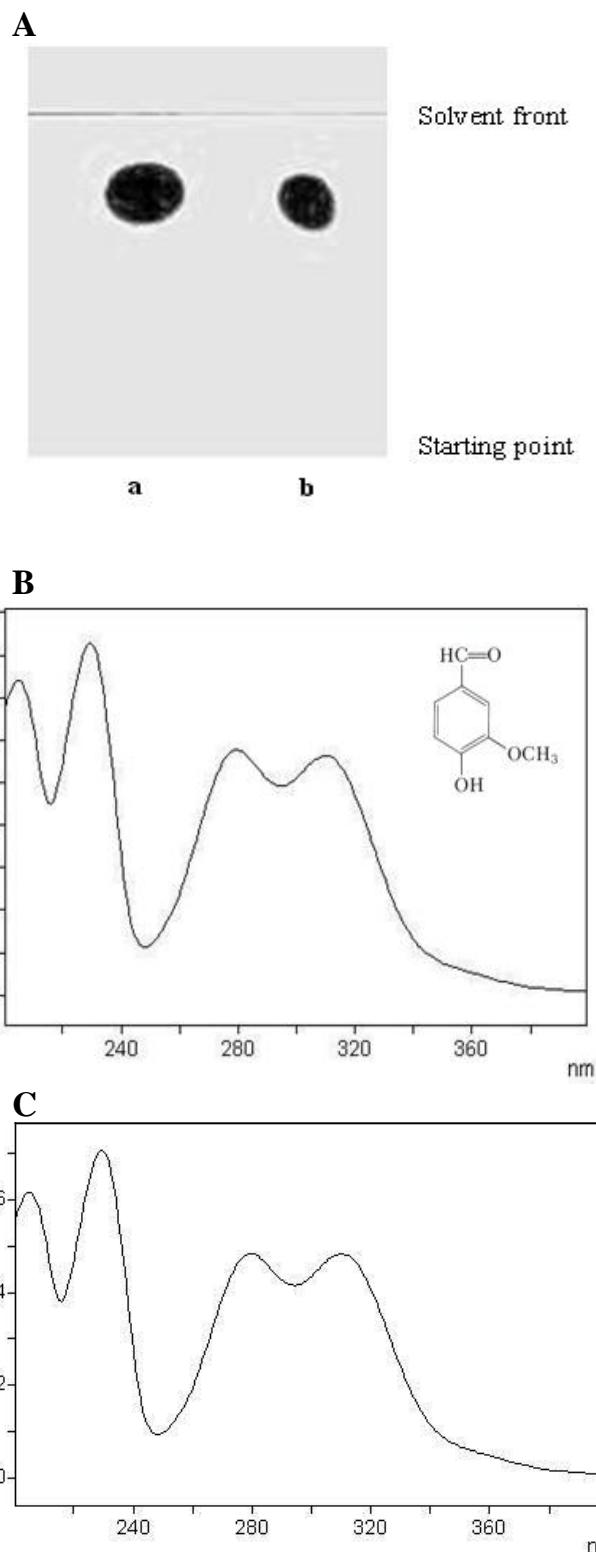
همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده بیشترین مقدار وانیلین تولیدی (۸۸۰ mg/l) از ۱٪ ایزاواوژنول، بعد از ۹۶ ساعت واکنش بیوتانسفورماسیون مشاهده شد. در این تحقیق راندمان مولی تهیه وانیلین از ایزاواوژنول ۹/۵ درصد بود. باید تأکید کرد که این راندمان در شرایط بهینه نشده (non-optimized) حاصل شده است. بنابراین، به نظر می‌رسد که در صورت بهینه کردن شرایط فیزیکی شیمیایی کشت و همچنین از طریق بهینه‌سازی ملکولی بتوان این راندمان را به طرز چشمگیری افزایش داد.

• بحث

گرایش جوامع بشری به فراورده‌های طبیعی در سال‌های اخیر موجب ترغیب محققان در استفاده از زیست واکنش‌گرهای میکروبی برای سنتز محصولات طبیعی شده است. یکی از رویکردهای نوین برای تولید ترکیبات معطر طبیعی استفاده از فرایند زیست تبدیلی میکروبی است. فرایند زیست تبدیلی میکروبی اولاً فرایندی همسو و متناسب با محیط زیست است (شیمی سبز) و ثانیاً ترکیبات معطر تولیدی به وسیله این فرایند، جزء ترکیبات معطر طبیعی طبقه‌بندی می‌شوند. بنابراین، در بازارهای جهانی با استقبال فراوانی از سوی مصرف‌کنندگان مواجه می‌شوند. در دو دهه اخیر، تلاش‌های بسیاری برای تولید وانیلین طبیعی از پیش‌سازهای فنلی مختلف صورت پذیرفته که به شناسایی باکتری‌های مختلف تولیدکننده وانیلین منجر شده است، اما با این حال تا به امروز به مرحله صنعتی نرسیده است. تولید ترکیبات معطر به وسیله دگرگون سازی میکروبی می‌تواند امکان تولید بیشتر محصول، تولید طعم‌های طبیعی، اطمینان از کیفیت ثابت و مطلوب محصول، آسانی مراحل خالص سازی و تولید ترکیبات ویژه‌ای را فراهم کند که با روش‌های مصنوعی امکان‌پذیر نیست.

در این مطالعه که برای اولین بار در ایران صورت پذیرفته، دگرگون سازی میکروبی ایزواواژنول به وانیلین به وسیله سویه‌های باکتری بومی جدا شده مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مرحله نخست ۲۴ سویه باکتری از خاک‌های جمع‌آوری شده از مزارع، گلخانه‌ها و باغچه‌های مناطق مختلف ایران جدا شد و تحمل‌پذیری ذاتی آنها نسبت به غلظت‌های مختلف ایزاواواژنول و وانیلین مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). در ادامه این تحقیق، پتانسیل سویه‌های دارای تحمل‌پذیری بالا برای بیوتранسفورماسیون ایزاواواژنول به وانیلین از طریق آنالیز TLC مورد ارزیابی قرار گرفته است (شکل ۱). بیشترین میزان وانیلین در سویه غربال‌گری شده KOA1 مشاهده شد. سویه KOA1 از خاک‌های جمع‌آوری شده از مزارع کشت ریحان در کردستان جدا شد و براساس مطالعات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و انجام تست‌های بیوشیمیایی متعدد به طور موقت در جنس *Pseudomonas* طبقه‌بندی شده است.

در این تحقیق، میزان وانیلین تولید شده از طریق استخراج با بی‌سولفات سدیم و آنالیز آن با روش پیشنهادی



شکل ۳-A-۳ TLC حاصل از وانیلین سنتز شده و وانیلین استاندارد B و C : طیف UV گرفته شده از وانیلین سنتز شده و وانیلین استاندارد

است، اما با استفاده از تکنیک‌های بهینه‌سازی شامل بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت، پارامترهای فیزیکی، جهش‌زایی و مهندسی متابولیک می‌توان امیدوار بود که این راندمان به طور چشمگیری افزایش یابد. در حال حاضر این تکنیک‌های بهینه‌سازی در دست اقدام هستند.

AOAC مورد سنجش قرار گرفته است. همان گونه که در شکل ۲ نشان داده شده، بیشترین میزان وانیلین تولیدی (۸۸ mg/l) از ۱٪ ایزواوژنول و پس از ۹۶ ساعت واکنش بیوتانسفورماسیون مشاهده می‌شود. راندمان مولی حاصل ۹/۵٪ است. با اینکه راندمان وانیلین تهیه شده از ایزواوژنول به وسیله سویه بومی غربالگری شده نسبتاً پایین

• References

- Priefert H, Babenhorst J, Steinbuchel A. Biotechnological production of vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 56:296-314.
- Cerrutti P, Alzamora SM. Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purees. *Int J Food Microbiol* 1996; 29: 379-386.
- Childers NF, Cibes HR, Hernandez-Medina E. Vanilla-the orchid of commerce. In: Wither CI, editor the orchids; a scientific survey, New York: Ronald press 1959. p. 477-508.
- Rao RS, Ravishankar GA. Vanilla flavor: production by conventional and biotechnological routes. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 289-304.
- Clark GS. Vanillin. *Perfum Flavour* 1990; 15: 45-54.
- Hagedorn S, Kaphammer B. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annual Rev Microbiol* 1994; 48: 773-800.
- Lomascolo A, Stentelair C, Asther M, Laurence LM. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavors for the food industry. *Trends Biotechnol* 1999; 17: 282-289.
- Walton NJ. Molecules of interest: vanillin. *Photochemistry* 2003; 63: 505-515.
- Benedict CO, Victorio V. Constructions of recombinants *Pseudomonas putida* BO14 and *Escherichia coli* QEFCA8 for Ferulic acid biotransformation to vanillin. *J Biosci Bioeng* 1999; 88:103-110.
- Karmakar B, Vohra RM, Nandanwar H, Sharma P, Gupta KG, Sobti RC. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *J Biotechnol* 2000; 80:195-202.
- Mulheim A, Muller B, Munch T, Wetli M; inventors. Microbiological process for producing vanillin. US patent 6235507. May 22, 2001.
- Stentelair C, Lesage-Meessen L, Oddou J, Bernard O, Bastin G, Ceccaldi BC, et al. Design of a fungal bioprocess for vanillin production from vanillic acid at scalable level by *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biosci Bioeng* 2000; 89:223-230.
- Rabenhorst J, Hopp R; inventors. Process for the preparation of vanillin. US patent 5017388. May 21, 1991.
- Markus PH, Peters ALJ, Roos R; inventors. Process for the preparation of phenylaldehydes. European patent EP542348. July 7, 1992.
- Shimoni E, Ravid U, Shoham Y. Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *J Biotechnol* 2000; 78:1-9.
- Kasana RC, Sharma UK, Sharma N, Sinha AK. Isolation and identification of a novel strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of transforming isoeugenol to vanillin. *Curr Microbiol* 2007; 54:457-461.
- Hua D, Ma C, Lin S, Song L, Deng Z, Maomy Z, et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: Identification of major metabolites. *J Biotechnol* 2007; 130:463-470.
- Müller B, Münch T, Mulheim A, Wetli M; inventors. Process for the production of vanillin. European patent EP0885968. December 6, 1998.
- Rabenhorst J, Hopp R; inventors. Process for the preparation of vanillin and suitable microorganisms. European patent EP0761817. August 7, 1994.
- Overhage J, Priefert H, Rabenhorst J, Steinbuchel A. Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (*vdh*) gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 52:820-828.
- Abraham WR, Arfmann HA, Stumpf S, Washausen P, Kieslich K (1988) Microbial transformations of

- some terpenoids and natural compounds. In: Schreier P (ed) Bioflavour '87. Analysis, biochemistry, biotechnology. Proceedings of an International Conference. Berlin: de Gruyter, pp 399–414.
22. Washington JA, Sutter VL. Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In: Lennette EH, Balows A, Hausler JR, WJTruant J, editors. Manual of clinical microbiology, 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1980 p. 453-458
23. AOAC Official Methods of Analysis, Arlington, VA, USA, Association of Analytical Communities 1995.