

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

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

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

۲- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۵

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۱۵

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 تنهایی قادر به تامین بازارهای 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 ایزواوژنول بررسی شد.

مواد و روش‌ها: میزان تحمل‌پذیری سویه‌های باکتریایی جدا شده به ایزواوژنول و وانیلین، به روش رقت در آگار تعیین شد. غربال‌گری اولیه سویه‌های باکتریایی با قابلیت تبدیل ایزواوژنول 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 TLC و UV مورد شناسایی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیشترین غلظت وانیلین تولید شده (۸۸۰ میلی گرم در لیتر) توسط سویه KOA1 در دمای ۳۰°C و دور شیکر ۱۵۰ rpm پس از ۹۶ ساعت واکنش زیست تبدیلی به دست آمد. در این تحقیق راندمان مولی تهیه وانیلین طبیعی از ایزواوژنول 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 ایزواوژنول است.

واژگان کلیدی: ایزواوژنول، زیست تبدیلی میکروبی، وانیلین

• مقدمه

امروزه، زیست واکنش‌گرهای میکروبی به طور روزمره در صنایع غذایی و به طور فزاینده‌ای 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 استروئیدی، پروستاگلندین‌ها، انواع آنتی‌بیوتیک‌های خاص، نگهدارنده‌های غذایی و انواع ترکیبات معطر اشاره کرد. وانیلین یا ۴-هیدروکسی-۳-متوکسی 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

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 Harman و Riemer 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 تجاری از وانیلین در بازارهای جهانی موجود است: وانیلین شیمیایی که عمدتاً از پیش‌سازهای لیگنینی و گایاکول سنتز می‌شود و قیمت تمام شده آن حدود ۱۵ دلار به ازای هر کیلوگرم است (۵، ۶) و دیگری وانیلین طبیعی که از طریق استخراج الکلی از دانه‌های گیاه *Vanilla planifolia*

تهیه می‌شود و قیمت تمام شده آن حدود ۱۲۰۰ تا ۴۰۰۰ دلار به ازای هر کیلوگرم است (تقریباً ۲۵۰ بار گران‌تر از وانیلین سنتتیک) (۷). دلایل بالا بودن قیمت تمام شده وانیلین طبیعی عمدتاً 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 متوکسی فنل‌های با ارزش، زیست تبدیلی میکروبی است.

منظور از زیست تبدیلی میکروبی، استفاده از میکروارگانیسم‌ها 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 (۹-۱۱)، وانیلیک اسید (۱۲)، اوژنول (۱۳) و ایزواوژنول (۱۴-۱۷) به وانیلین با استفاده از میکروارگانیسم‌های 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 اوژنول و ایزواوژنول متمرکز شده است. فنیل پروپانوئیدهای لیگنینی مانند اوژنول و ایزواوژنول 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 میکروارگانیسم‌ها مانند: *Aspergillus niger*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus fusiformis* و *Rhodococcus rhodocourous* و *Pseudomonas putida* می‌توانند ایزواوژنول را به وانیلین تبدیل کنند (۱۶، ۱). با توجه به اینکه وانیلین به عنوان یک حد واسطه اصلی در مسیر تجزیه ایزواوژنول ایجاد می‌شود، تحقیقات گسترده‌ای در ارتباط با تهیه وانیلین از ایزواوژنول صورت پذیرفته است. راندمان تولید وانیلین در اثر

اکسید شدن وانیلین به وانیلیک اسید یا احیا به وانیلیل الکل توسط میکروارگانیسم، پایین است (۲۰). در اولین گزارش منتشر شده، غلظت و راندمان مولی وانیلین ایجاد شده از ایزواوژنول به وسیله سویه خاصی از قارچ *Aspergillus niger* به ترتیب ۰/۸ 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 ایزواوژنول به وسیله سویه خاصی 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 ایزواوژنول 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 ایزواوژنول نسبتاً پایین بوده؛ ولی با این حال با توجه به ارزان بودن و در دسترس بودن، همچنان ایزواوژنول به عنوان سوبسترای پیش‌ساز برای تولید وانیلین پیشنهاد می‌شود. در این پژوهش که برای اولین بار در ایران صورت می‌گیرد، تولید وانیلین از ایزواوژنول به وسیله سویه‌های باکتری بومی جدا شده، مورد مطالعه قرار گرفته است.

• مواد و روش‌ها

مواد و دستگاه‌ها: مواد شامل ایزواوژنول ۹۸٪ (مخلوط 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.

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

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

Glucose ۰/۵, Yeast extract ۰/۰۵, (NH₄)₂SO₄ ۰/۲, CaCl₂.2 H₂O ۰/۰۲, KH₂PO₄ ۰/۰۳, Na₂HPO₄.12H₂O ۰/۱۵, MgSO₄.7H₂O ۰/۰۵

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 جداکننده جدا شد. محلول‌های کلروفرم جمع آوری شده توسط دستگاه روتاری تبخیر شد. جسم روغنی جدا شده در ته بالن در کلروفرم تغلیظ شد و با استفاده از فاز متحرک هگزان: اتیل استات (به نسبت ۳ به ۴) مورد آنالیز TLC قرار گرفت.

زیست تبدیلی ایزواوژنول به وانیلین به وسیله کشت رویشی سویه KOA1: سویه KOA1 که براساس آنالیز TLC بیشترین تولید وانیلین را داشت، در محیط بیوترانسفورماسیون طراحی شده (GY) در ۳۰°C و ۱۵۰rpm به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شد و سپس ایزواوژنول در غلظت ۰/۱ تا ۲٪ (حجمی/حجمی) به محیط اضافه شد. نمونه‌ها در فواصل زمانی مختلف برداشت و سانتریفوژ شد (۳۵۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه). سپس از مایع رویی برای تعیین غلظت وانیلین تشکیل شده در مخلوط واکنش از طریق استخراج با محلول بی سولفیت سدیم اشباع تعیین غلظت آن به وسیله روش AOAC (۲۳) با اندکی تغییر، 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 بی سولفیت 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 ۳۰°C به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته با کدورتی معادل ۵/۱ مک فارلند (میکروب تلقیح شده ۱۰^۸ cfu/ml) تهیه

سویه‌ها و شرایط کشت: ۲۴ 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):

(NH₄)₂SO₄ ۰/۲, CaCl₂.2 H₂O ۰/۰۲, MgSO₄.7H₂O ۰/۰۵, FeSO₄.7H₂O ۰/۰۰۲۵, KH₂PO₄ ۰/۰۰۳, Na₂HPO₄.12H₂O ۰/۱۵

در موارد لزوم برای جامد کردن محیط کشت به آن ۲٪ آگار اضافه شد. pH محیط کشت قبل از اتوکلاو کردن با هیدروکسید سدیم یک نرمال به حدود ۷ رسانده شد. پس از اتوکلاو کردن، غلظت مشخصی از ایزواوژنول (۰/۱ درصد حجمی/حجمی) به عنوان تنها منبع کربن و انرژی، پس از استریل کردن از طریق پالایه‌های غشایی (میلی پور) با قطر سوراخ ۰/۲۲ میکرونی به آن اضافه شد.

غربال گری سویه‌های با قابلیت تحمل پذیری غلظت‌های بالای ایزواوژنول و وانیلین: برای تعیین میزان تحمل‌پذیری سویه‌های جدا شده نسبت به ایزواوژنول و وانیلین از روش رقت در آگار استفاده شد (۲۲). به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ ml از نوترینت آگار ذوب شده، تراکم خاصی از ایزواوژنول و وانیلین اضافه شد و سپس داخل پلیت‌های شیشه‌ای به قطر ۸cm ریخته شد. محلول‌های استوک ایزواوژنول و وانیلین در دی متیل فرامید (DMF) تهیه شد و با پالایش از طریق پالایه‌های غشایی (میلی پور) با قطر سوراخ ۰/۲۲ میکرونی استریل شد. میزان تراکم استفاده شده برای ایزواوژنول و وانیلین برحسب میلی‌مولار به ترتیب عبارت بود از: ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵ و ۸۰ برای ایزواوژنول و ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ میلی‌مولار برای وانیلین. پلیت‌های آگاردار در دمای ۴۰°C به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند تا سطح مرطوب آنها خشک شود و سپس به وسیله سمپلر ۱۰ میکرولیتر از محیط مایع که میکروب مورد نظر در آن رشد کرده بود (رشد لگاریتمی) و تراکم آن ۰/۵ مک فارلند بود روی محیط آگاردار قرار گرفت (میکروب تلقیح شده ۱۰^۸ cfu/ml). پلیت‌ها پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۰°C در ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ مورد مطالعه قرار گرفتند.

باکتریایی، شناسایی باکتری‌های تحمل‌پذیر 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 بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین مفید باشند (۲۲). در این راستا ۲۴ سویه باکتری از خاک‌های مناطق مختلف ایران بر اساس تکنیک غنی سازی جدا شدند. تحمل‌پذیری ذاتی این سویه‌ها نسبت به ایزواوژنول و وانیلین به وسیله روش رقت در آگار تعیین شد (جدول ۱).

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

وانیلین (C ₈ H ₈ O ₃)	ایزواوژنول (C ₁₀ H ₁₂ O ₂)	سویه باکتری
>۴۰	>۸۰	KOA1
۳۵	۷۵	KOA18
۳۵	۷۰	IMPA21
۳۰	۶۵	IDA16
<۲۵	<۵۵	سایر ۲۰ سویه

از بین ۲۴ سویه باکتری جدا شده، ۴ سویه باکتری (KOA1، KOA18، IMPA21 و IDA16) که بالاترین تحمل‌پذیری را نسبت به ایزواوژنول و وانیلین از خود نشان دادند (بالاتر از ۱۰ g/l برای ایزواوژنول و ۵ g/l 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 KOA1 (Lane A) بیشترین مقدار وانیلین را تولید کرده است. این سویه از خاک جمع‌آوری شده از مزارع کشت ریحان در کردستان جدا شد. سویه KOA1 یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، غیر اسپوردار، متحرک و تولیدکننده کاتالاز و اکسیداز بود. براساس مطالعات فنوتیپی، فیزیولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی متعدد و همچنین مطالعه ویژگی‌های این باکتری با سایر باکتری‌های شناخته شده می‌توان به طور موقت سویه KOA1 را در جنس *Pseudomonas* طبقه‌بندی کرد (داده‌ها نشان داده نشده است).

کرده و ۵ ml به محیط بیوترانسفورماسیون 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 گرمخانه‌گذاری شد.

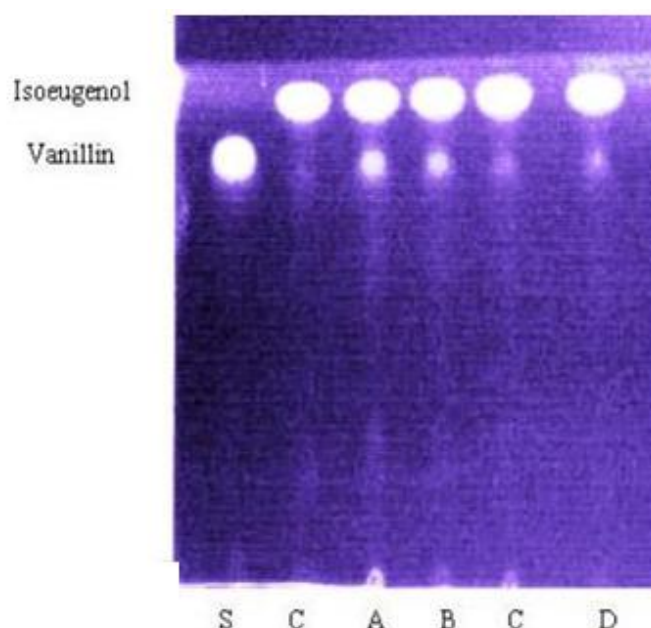
در فواصل زمانی مشخص، مایع رویی را جدا کرده، ابتدا به وسیله محلول اسید سولفوریک ۱۰ نرمال به دقت اسیدی کرده سپس هم حجم آن کلروفرم اضافه شد. فاز کلروفرمی از فاز آبی به وسیله قیف جداکننده جدا شد. فاز آبی دوباره به وسیله کلروفرم شست و شو داده شد. این عمل ۵ بار تکرار شد. به محلول کلروفرم جمع‌آوری شده، به میزان ۲/۵ برابر حجم آن، محلول بی سولفیت 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 جداکننده 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 ۵٪ 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 TLC 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

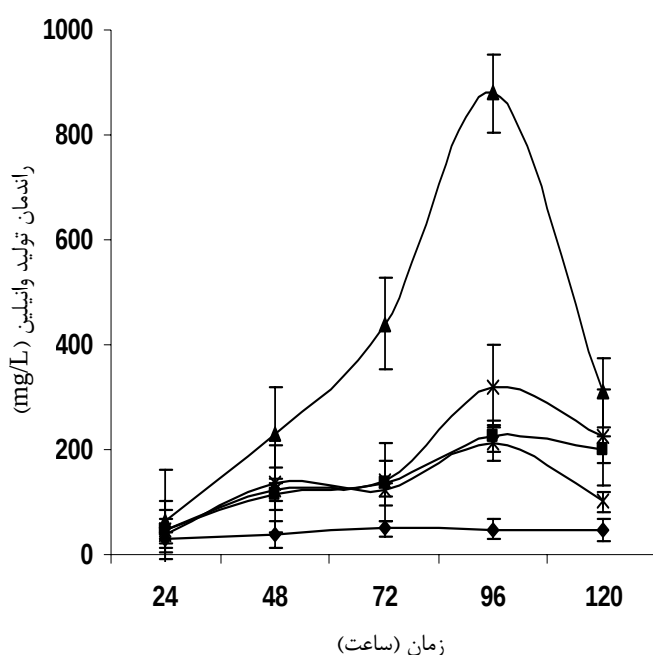
جداسازی سویه‌های باکتری دارای تحمل‌پذیری بالا با قابلیت تبدیل ایزواوژنول به وانیلین: با توجه به سمیت سوبسترا (ایزواوژنول) و محصول (وانیلین) روی سلول‌های

شناسایی وانیلین: برای اثبات وجود وانیلین در مخلوط واکنش بیوترانسفورماسیون، 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 ایزواوژنول (b) بیانگر حصول وانیلین از ایزواوژنول 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 اسپکتروفتومتر UV-Vis گرفته شد (شکل ۳ قسمت های C, B). همان گونه که در شکل نشان داده شده، وجود منحنی های مشابه بیانگر حصول وانیلین از ایزواوژنول است.



شکل ۱- بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین

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



شکل ۲- اثر غلظت های اولیه ایزواوژنول و زمان انکوباسیون روی بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین در سویه باکتری KOA1 در محیط پایه GY. غلظت های ایزواوژنول (درصد حجمی/حجمی): (◆) ۰/۱، (■) ۰/۵، (▲) ۱، (×) ۱/۵، (✱) ۲. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش و بار معرف ± 1 انحراف معیار است.

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

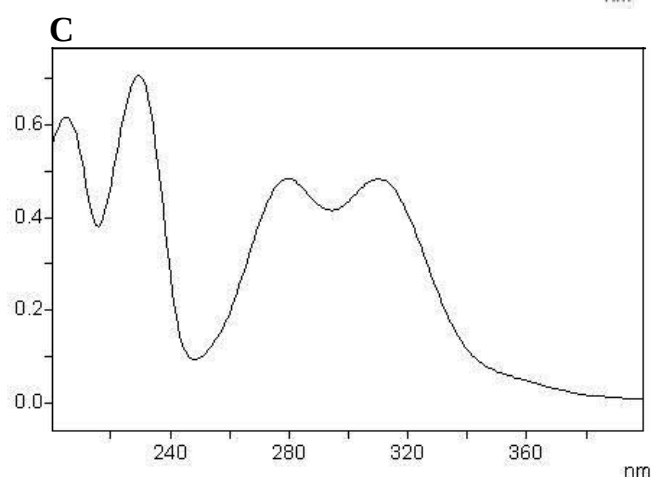
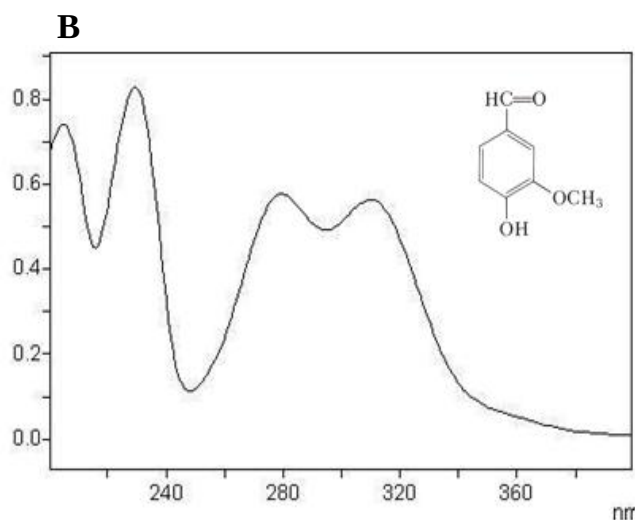
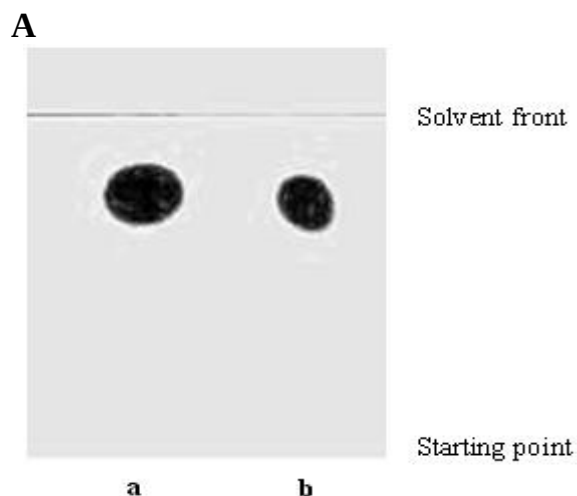
همان گونه که در شکل ۲ نشان داده شده بیشترین مقدار وانیلین تولیدی (880 mg/L) از ۱٪ ایزواوژنول، بعد از ۹۶ ساعت واکنش بیوترانسفورماسیون مشاهده شد. در این تحقیق راندمان مولی تهیه وانیلین از ایزواوژنول ۹/۵ درصد بود. باید تأکید کرد که این راندمان در شرایط بهینه نشده (non-optimized) حاصل شده است. بنابراین، به نظر می رسد که در صورت بهینه کردن شرایط فیزیکی شیمیایی کشت و همچنین از طریق بهینه سازی 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 طبقه بندی 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 ایزواوژنول 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 ایزواوژنول و وانیلین مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). در ادامه این تحقیق، پتانسیل سویه‌های دارای تحمل‌پذیری بالا برای بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول 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 بی‌سولفیت سدیم و آنالیز آن با روش پیشنهادی



شکل ۳-A-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 (880 mg/l) از ۱٪ ایزواوژنول و پس از ۹۶ ساعت واکنش بیوترانسفورماسیون 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, Stentelaire 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.
- Stentelaire 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, Welti 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.