جداسازی میکروارگانیسم های تبدیل کننده β-پینن به α-پینن از گیاه باریجه و صمغ آن

فرشته جوکار کاشی[1،*]، جمشید فولادی[1] و منصور بیات[2]

[1] تهران، دانشگاه الزهراء(س)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[2] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد علوم و تحقیقات

تاریخ دریافت: 86/1/22 تاریخ پذیرش: 87/6/11

چکیده

در این پژوهش با استفاده از روشهای غربال سازی ، میکروارگانیسمهایی از گیا ه باریجه ، خاکهای اطراف آن و صمغ باریجه که منبع با ارزشی از اترهای روغنی می باشند، جداسازی گردید. 24 میکروارگانیسم (15 قارچ ، 9 باکتری) از نمونه های ذکر شده جداسازی و توانایی تولید α- پینن از β- پینن میکروارگانیسم ها سنجش شد . محیط واکنش تجزیه و تبدیل بیولوژیکی شامل (یک گرم زیتوده ، µl 100 β-پینن در 100 ml بافر فسفات با pH 6 بود که به مدت 22 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد با دورrpm 150 همزده و محصولات حاصل از واکنش دگرگونی بیولوژیکی توسط n-هگزان استخراج و با دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شد. به این ترتیب یک جدایه باکتری که قادر به تبدیل β- پینن به α- پینن بود شناسائی گردید. آزمایشات بهینه سازی برای پارامترهای محیط کشت از جمله منبع کربن و نیتروژن انجام گرفت . بیشترین زیتوده میکروبی در حضور 30g/l گلیسرین به میزان 33/59 g/l و در حضور 7 g/l اوره به میزان 40/44 g/l تولید شد.آزمایشات نشان داد که با بهینه سازی پارامترهای محیط کشت میزان تبدیل β-پینن به α-پینن افزایش یافت. بیشترین تولید α-پینن در حضور 20 گرم بر لیتر گلیسرین به عنوان منبع کربن به میزان 0/133 درصد و در حضور 7 g/l اوره به میزان 0/205 درصد به عنوان منبع نیتروژن به دست آمد.

واژه های کلیدی : اسانسهای طبیعی ، گیاه باریجه ، تجزیه و تبدیل بیولوژیکی ، β-پینن ، α-پینن

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: 0361-4227208، پست الکترونیک: fereshtehjookar@yahoo.com

مقدمه

امروزه از فنون مختلفی برای تولید طعم دهنده های غذایی و آشامیدنی استفاده می شود. اگرچه طعم دهنده های شیمیایی مصنوعی هنوز هم به طور وسیع مورد استفاده واقع شده اما با توجه به آگاهی بیشتر مصرف کنندگان نسبت به عواقب استفاده از طعم دهنده های شیمیایی ، کاربرد اسانس با پایه بیولوژیکی مورد توجه خاص قرار گرفته است(11).

استفاده از اترهای روغنی برای تهیه عطر از سالها قبل یک سنت بوده است از 3200 سال پیش از میلاد مسیح تکنولوژی هایی برای تولید اترهای روغنی اولیه از گیاهان ، میوه ها و سبزیها به کار می رفت(3 و 6).

خیلی از ترپن ها بصورت طبیعی چندان با ارزش نیستند و عطر و بوی مطلوب ندارند . بنابراین برای بهتر شدن کیفیت ، تغییراتی در آنها صورت می گیرد ترکیبات ترپنی به راحتی و با قیمت کم در دسترس بوده و آغاز گر خوبی برای محصولات طبیعی محسوب می شوند . یکی از ترپن ها β-پینن است که منوترپن دو حلقه ای و به عنوان پیش ساز با ارزشی برای ساخت ترکیبات طعم دهنده محسوب می شود. منوترپن ها ، ترپن های ده کربنه ، به صورت منو

و دی سیکلیک هستند و می توان آنها را به گروههایی تقسیم کرد (9 و 12).

گیاهان ، منبع خوبی برای اترهای روغنی به شمار می آیند. از جمله این گیاهان باریجه(*Ferula galbanum Boiss*) را می توان نام بردکه صمغ حاصل از این گیاه حاوی 6 درصد اترهای روغنی است و بنا به نوع گیاه و محیط جغرافیائی تقریبا 50 درصد از اترهای روغنی را β-پینن تشکیل می دهد. β-پینن می تواند سوبسترای خوبی برای تبدیل به α-پینن باشد(9 و 12).

α- پینن نیز، ترکیبی گران قیمت و کمیاب است که در صنعت اسانس کاربرد زیادی دارد و از طرفی α-پینن طبیعی به میزان کافی به اندازه ای که جوابگوی صنعت اسانس باشد در دسترس نیست. بنابراین تولید طبیعی این ترکیب بسیار حائز اهمیت است.

گیاه باریجه در شمال و غرب کشور ایران رشد می کند. از سالها قبل ایران جزء مهمترین صادر کننده این گیاه محسوب می شده است. آنالیز صمغ این گیاه ، نشان داد که این صمغ از 67 درصد رزین، 19 درصد مواد محلول در آب و 6 درصد اترهای روغنی تشکیل شده است. اترهای روغنی تشکیل دهنده گیاه باریجه شامل 50 درصد β- پینن، 18/3 درصد α- پینن، 6/7 درصد 3-carene، 3/3 درصد α-thujene و 3/1 درصد sabinene می باشد و این اجزاء تشکیل دهنده بستگی به نوع گیاه، منطقه جغرافیائی آب و هوا و غیره متفاوت است (9 و12) .

لازم به ذکر است که یک نوع از گیاه باریجه در افغانستان رشد می کند که مرغوبیت آن نسبت به نوع ایرانی کمتر است. این گیاه، چتری و از گیاهان بومی ایران به شمار می آید. صمغ باریجه امروزه همچنان به عنوان یک منبع تأمین کننده اترهای روغنی بویژه β- پینن ، α- پینن و δ-3-carene مورد توجه صنعت اسانس قرار می گیرد. از دهه 60 میلادی قرن بیستم ایران یکی از مهمترین تأمین کننده های صمغ باریجه به شمار می آید در گذشته عطریات حاصل از باریجه متعلق به مصر باستان ، همچون عطریات پاریس امروزی مشهور بوده است و فقط امروزه فرمول عطریات استاندارد شده است (8).

هدف از این تحقیق، دستیابی به میکروارگانیسمهایی است که بتوانند بعنوان بیوکاتالیزور در راه اندازی واکنش دگرگونی ایزومری. β- پینن به α- پینن استفاده شوند. تجارب غربال سازی (Screening) همیشه این احتمال که سویه های کارآمد را ابتدا می توان در محیطهای اکولوژیکی با سوبسترا و یا محصول واکنش مناسب پیدا نمود را در نظر می گیرد، برای این منظور منطقه اکولوژیکی که حاوی مقدار زیادی β-پینن، گیاه باریجه و خاکهای اطراف آن در نظر گرفته شد.

مواد و روشها

در این تحقیق برای جداسازی میکروارگانیسم ها به عنوان بیوکاتالیزور واکنشهای تجزیه و تبدیل اترهای روغنی از محیطهای اکولوژیکی ، نمونه برداری شد که روغنهای اتری به طور طبیعی حضور دارند و احتمال حضور میکروارگانیسمهایی که خود را با این شرایط تطبیق داده اند زیاد است. بدین ترتیب شانس دستیابی و جداسازی میکروارگانیسم های قادر به دگرگونی بیولوژیکی بسیار قوی تر به نظر می رسد. گیاه باریجه و به عبارت دیگر صمغ آن حاوی میزان قابل توجهی از اترهای روغنی (بنابه شرایط جغرافیایی و آب و هوایی تا نزدیک به 28 درصد صمغ را روغن تشکیل می دهد) می باشد و در این میان سهم β- پینن در این روغن کمپلکس بسیار قابل توجه می باشد. به این ترتیب از گیاه ، صمغ و خاک اطراف گیاه باریجه نمونه برداری شد. نمونه ها از استان خراسان و کاشان به علت دسترسی آسانتر جمع آوری و در شرایط کاملاً استریل، درون ظروف مخصوص و از قبل استریل شده به آزمایشگاه انتقال داده شدند. ابتدا از نمونه های ذکر شده در شرایط کاملاً استریل به میزان 10 گرم وزن شد و سپس به طور جداگانه 90 میلی لیتر سرم فیزیولوژی

استریل به آنها اضافه و به کمک همزن هم زده شد به طوری که نمونه ها در محلول کاملاً حل شدند . در مورد نمونه های صمغ به این علت که از نوع روغنی بوده و به خوبی در آب حل نمی شوند از توئین 80 به عنوان امولسیفایر استفاده گردید. 0/1 گرم توئین 80 به مخلوط مورد نظر افزوده و به کمک همزن هم زده شد. یک میلی لیتر از رقت تهیه شده از هر نمونه به طور جداگانه در داخل پلیت های حاوی محیط کشتهای نظیر نوترینت آگار، سابوردکستروز آگار، بلاد آگار، سیتریماید آگار ومک کانکی آگار ریخته و به وسیله میله شیشه ای پخش شدند. سپس پلیت ها در دمای 30 درجه سانتی گراد بسته به نوع نمونه به مدت 24 تا 48 ساعت گرماگذاری و پس از آن بر اساس اختلافات مورفولوژیکی میکروارگانیسم ها جدا سازی گردید.

کشت جدایه ها بر روی یک محیط کمپلکس و دستیابی به زیتوده(Biomass): به منظور تهیه زیتوده از جدایه ها، از محیط کشت کمپلکس شامل پپتون 10 گرم در لیتر، عصاره مخمر 5 گرم در لیتر ، گلوکز 20 گرم در لیتر، کلرید سدیم 2 گرم در لیتر، سولفات منیزیم 0/2 گرم در لیتر و فسفات هیدروژن پتاسیم 0/5 گرم در لیتر استفاده گردید. pH محیط کمپلکس برای جدایه های باکتریایی 6/8 و برای جدایه های قارچی 5/3 تنظیم شد. محیط پیش کشت جدایه ها در محیطهای (نوترینت آگار برای نمونه های باکتری و سابرودکستروز آگار برای نمونه های قارچی) کشت خطی داده شده و به مدت 24 ساعت در دمای 30 درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید از کلونیهای رشد یافته بر روی این محیطها، یک لوپ درون ارلنهای شیاردار (baffled Erlenmeyer flask)250 میلی لیتری حاوی 50 میلی لیتری محیط کشت کمپلکس تلقیح گردید و سپس به طور کامل هم زده شد. ارلن های شیاردار حاوی محیط کشت کمپلکس درون شیکر انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی گراد و دور 100 rpm هم زده شد پس از 18 الی 20 ساعت (البته بر حسب نوع میکروارگانیسم ممکن است این زمان متفاوت باشد)، کدورت نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 620 nm اندازگیری شده و کدورت نمونه های مورد نظر طبق این شرایط 0/1 (برابر نیم مکفارلند 10^8 cfu/ml ×1/5) گردید.

محیط تولید زیتوده: یک میلی لیتر از محیط پیش کشت با کدورت 0/1 (برابر نیم مکفارلند 10^8 cfu/ml ×1/5) درون ارلن های شیار دار 500 میلی لیتری حاوی 100 میلی لیتر محیط کمپلکس تلقیح و سپس ارلن ها در دمای 37 درجه سانتی گراد و در شیکر انکوباتور با دور 100 rpm همزده شد. زیتوده را می توان پس از گذشت 54 ساعت از محیط تولید جداسازی کرد. در شرایط کاملاً استریل مایع رویی به لوله های سانتریفیوژ به ظرفیت 50 میلی لیتر که قبلاً کامل استریل شده منتقل گردید و سپس به کمک سانتریفیوژ یخچال دار در دمای 4 درجه سانتی گراد و دور g × 0 1130 و زمان 20 دقیقه روتور نوع BN سانتریفیوژ گردید. سپس لوله های سانتریفیوژ از دستگاه خارج شده و روشناور تحت شرایط کاملاً استریل خارج شد. سلولهای رسوب کرده در ته لوله های سانتریفیوژ در سرم فیزیولوژی حل شد و سپس به لوله های اپندورف 1/5 میلی لیتری که قبلاً استریل شده منتقل گردید. سوسپانسیون حاصل به کمک میکروفیوژ با دمای 4 درجه سانتی گراد و دورrpm 12000 به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس روشناور خارج و سلولهای رسوب شده دوباره در سرم فیزیولوژی حل شده و مثل مرحله قبل سلولها با میکروفیوژ رسوب داده شد (مرحله شستن زیتوده).

به این ترتیب زیتوده تولید شده دوبار توسط سرم فیزیولوژی شستشو گردید. رسوب حاصل برای انجام آزمایش واکنش دگرگونی بیولوژیکی مورد استفاده قرار گرفت. گاهی اوقات زیتوده ای که دوبار شسته شده در

یخچال در دمای20- درجه سانتی گراد نگهداری شده تا در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

طراحی واکنش دگرگونی بیولوژیکی: واکنش دگرگونی بیولوژیکی برای اولین بار به منظور غربال سازی جدایه های تبدیل کننده β- پینن به α- پینن طراحی و تاکنون در هیچ منبع علمی گزارش نشده است. درون ارلن شیاردار 500 میلی لیتری، مقدار 100 میلی لیتر بافر فسفات با pH بهینه ریخته و پس از اتوکلاو به آن 100 µl ازβ - پینن و یک گرم زیتوده که دو بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شده اضافه گردید و پس از همزدن داخل شیکرانکوباتور با دمای 37 درجه سانتی گراد با دور 150 rpm قرار گرفت. ارلن 500 میلی لیتری حاوی 100 میلی لیتر بافر فسفات با pH بهینه برابر با 6 و 100 µl ازβ - پینن به عنوان شاهد تهیه شد. تمام شرایط مانند واکنش قبلی بود به جز اینکه در این واکنش زیتوده به ارلن ها افزوده نمی شد و همراه با نمونه اصلی با شرایط یکسان در شیکر انکوباتور قرار می گرفت. از نمونه اصلی و شاهد در زمان صفر (آغاز واکنش) نمونه گیری به عمل آمد. برای جلوگیری از تغییر حجم واکنش به هنگام نمونه گیری، از هر یک از نمونه های شاهد و اصلی دو عدد ارلن تهیه گردید. پس از 22 ساعت ارلن ها از شیکر انکوباتور خارج شده و به روشی که قبلاً ذکر شد سانتریوفیوژ گردید پس از خروج روشناور، سلولهای رسوب شده در یک میلی لیتر از بافر فسفات با pH برابر 8 حل و سوسپانسیون آماده شده به ظروف شیشه ای کوچک منتقل گردید. سپس سونیکاسیون شامل 7 مرحله و هر بار یک دقیقه با فاصله زمانی یک دقیقه انجام گرفت. توان استفاده شده در این بررسی W= 100 بود. به دلیل تولید حرارت زیاد در حین سونیکاسیون، تمام مراحل در حمام یخ انجام گرفت. پس از سونیکاسیون، نمونه ها به کمک میکروفیوژ با دمای 4 درجه سانتی گراد و دور 12000 rpm به مدت 2 دقیقه سانتریفوژ گردید. روشناور به کمک n- هگزان استخراج و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شد.

آنالیز توسط GC : مقدار β- پینن و α - پینن با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی گازی 6890 series GC (Agilent system) با ستون کاپیلاری HP5 5% phenyl methyl siloxan 30 m سنجش شد. اندازه ستون (530 µm ×150 و از نوع HP5 5% phenyl methyl siloxan 30 m با FID detector بود. دمای injector : 50 درجه سانتی گراد و دمایی detector : 280 درجه سانتی گراد و برنامه دمائی : 50 درجه سانتی گراد برای یک دقیقه و با سرعت 5 درجه سانتی گراد در دقیقه دما بالا برده شد تا اینکه دما به 130 درجه سانتی گراد رسید و سپس با سرعت 30 درجه سانتی گراد بردقیقه دما بالا رفت تا به 280 درجه سانتی گراد رسید و در این دما به مدت پنج دقیقه نگه داشته شد . گاز حامل هلیوم و فشار سر ستون 13 psi و مقدار تزریق از هر نمونه 1µl بود.

نتایج

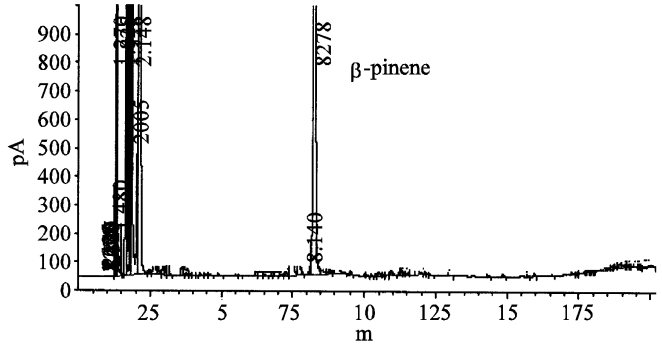
این تحقیق قسمتی از یک تحقیق گسترده برای جداسازی میکروارگانیسمهایی است که بتوانند واکنش تعریف شده تبدیل بیولوژیکی β- پینن به α- پینن را کاتالیز کنند. با این وصف 24 میکروارگانیسم از نمونه های مورد نظر جداسازی گردید که 15 جدایه از گیاه باریجه ، خاک اطراف که آلوده به صمغ این گیاه است جدا شده که این 15 جدایه شامل 5 جدایه باکتریائی و 10 جدایه قارچ و 9 جدایه دیگر هم از صمغ جدا شده که شامل 5 جدایه باکتریائی و 4 جدایه قارچ می باشد. مقایسه محصولات واکنش دگرگونی بیولوژیکی β- پینن به α- پینن با GC کروماتوگرام β- پینن و α- پینن استاندارد (شکل 1 و 2) نشان داد که از بین 24 جدایه یک جدایه باکتریایی قادر به انجام واکنش تبدیل β- پینن به α- پینن می باشد(شکل 3). این جدایه ها برای مطالعه بیشتر مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور برخی از پارامترهای محیطی و اجرای محیط کشت بهینه سازی و آزمایشات با سه بار تکرار انجام گرفت.

جدول 1- آزمایشهای انجام شده جهت شناسایی جدایه باکتریایی

رنگ آمیزی گرم	کاتالاز	اکسیداز	طرز قرار گرفتن	حرکت	اسپور	تخمیر گلوکز در شرایط بی هوازی	رشد نمک 5 درصد	مقاومت به لیزواستافین 200 میلی گرم در میلی لیتر	اریترومایسین	باسیتراسین	حساسیت به لیزوزیم	رشد در دمای 45 درجه
+	+	-	دستجات نامنظم	-	-	-	+	مقاوم	حساس	حساس	حساس	-

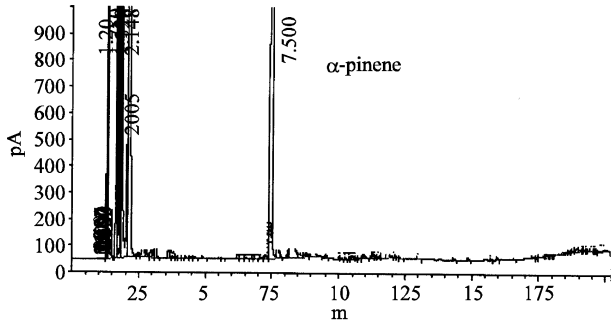
جدایه باکتریایی به کمک آزمونهای بیوشیمیایی شناسایی گردید. برای تحقیقات بهتر در زمینه موضوع، نیاز به اطلاعات کمی (مورفولوژیکی، بیوشیمیایی) در مورد باکتری وجود داشت. از این رو به منظور آشنایی بیشتر و داشتن پیش زمینه ذهنی درباره آن، معدودی از آزمونهای رایج میکروبیولوژیکی بر روی آن صورت گرفت (جدول1). نتایج نشان داد که جدایه باکتریایی ،گرم مثبت، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی است. بنابراین این جدایه می تواند متعلق به خانواده میکروکوکاسیه و گونه میکروکوکوس *Micrococcus sp.strain PIN* باشد.

از آنجا که غلظت بیوکاتالیزور با راندمان سرعت واکنش رابطه مستقیم دارد به این دلیل با افزایش غلظت بیوکاتالیزور تا آنجایی که منحنی میکائیلیس و منتن اجازه می دهد می توان افزایش غلظت محصول را مشاهده کرد با توجه به این دلایل برای افزایش غلظت بیوکاتالیزور برحسب امکانات برخی از فاکتورهای محیط کشت بهینه سازی گردید تا با افزایش زیتوده (بیوکاتالیزور) امکان دسترسی به محصول بیشتر فراهم گردد.

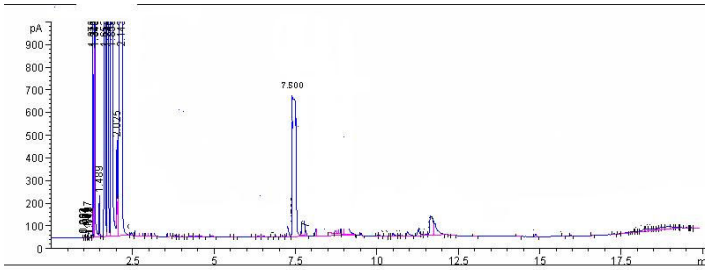


شکل 1: GC کروماتوگرام β-پینن استاندارد

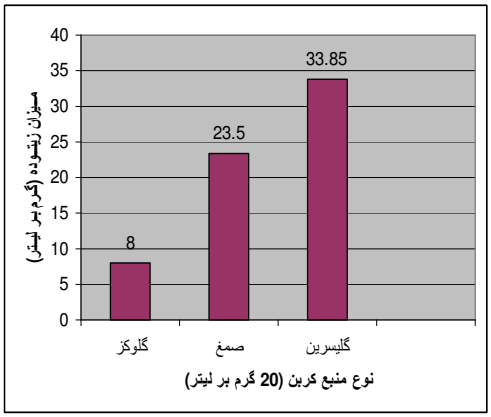
انتخاب نوع منبع کربن: به منظور بررسی تأثیر منبع کربن بر رشد سوش باکتریایی ، سه نوع منبع کربن شامل گلیسرین ، گلوکز و صمغ باریجه به غلظت 20 گرم بر لیتر انتخاب شد. برای رشد از محیط کشت کمپلکس استفاده گردید. میزان تولید زیتوده در حضور هر یک از این منابع کربنی سنجش شد. طبق نتایج، بیشترین زیتوده در حضور گلیسرین به عنوان منبع کربن به میزان 33/85 گرم بر لیتر تولید شد. شکل4 میانگین تولید زیتوده در حضور منابع کربن مختلف را نشان می دهد.



شکل 2: GC کروماتوگرام α –پینن استاندارد

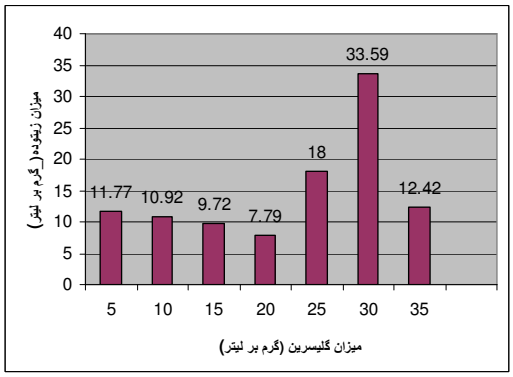


شکل 3 : GC کروماتوگرام مربوط به محصولات دگرگونی بیولوژیکی در سویه باکتریایی (37ºC ، 150 rpm ، pH 6 ، 22 h ،یک گرم زیتوده میکروبی)



شکل 4- میانگین تولید زیتوده در حضور منابع مختلف کربن (37 ºC ، 100 rpm ، pH 6/8 ، 54 h).

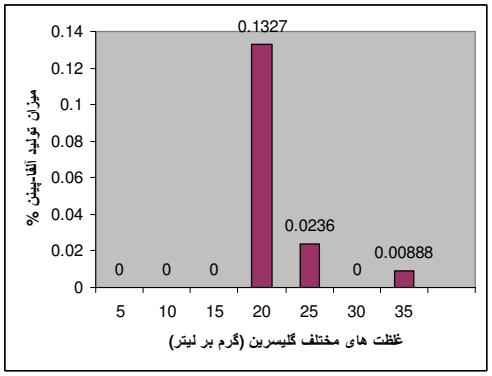
بررسی اثر غلظتهای مختلف گلیسرین بر رشد جدایه باکتریائی: تولید زیتوده در حضور غلظتهای مختلف گلیسرین (5 ، 10 ، 15 ، 20 ، 25 ، 30 ، 35 گرم بر لیتر) اندازگیری گردید. مراحل واکنش در قسمت قبل توضیح داده شد. میزان تولید زیتوده در حضور غلظتهای مختلف گلیسرین اندازگیری شده و طبق نتایج، بیشترین زیتوده در حضور غلظت 30 گرم بر لیتر گلیسرین به عنوان منبع کربن به میزان 33/59 تولید شد (شکل5) .



شکل5- میانگین تولید زیتوده در حضور غلظتهای مختلف گلیسرین (37 ºC ، 100 rpm ، pH 6/8 ، 54 h)

بررسی اثرغلظتهای مختلف گلیسرین برتبدیل β-پینن به α-پینن : به منظور سنجش اثر غلظتهای مختلف گلیسرین بر تبدیل β-پینن به α-پینن زیتوده حاصل از این غلظتها وارد واکنش دگرگونی بیولوژیکی گردید. بنابراین آزمون دگرگونی بیولوژیکی با شرایط pH برابر 6 و 150rpm µl 100 از β- پینن و به مدت زمان 22ساعت درحضوریک گرم زیتوده (حاصل ازغلظتهای مختلف کربنی) در دمای

37 درجه سانتی گراد انجام گرفت. محصولات حاصل از هر یک از این واکنشها استخراج و توسط دستگاه GC آنالیز گردید. آزمایشات نشان داد که در حضور زیتوده حاصل از 20 گرم در لیتر گلیسرین بیشترین تبدیل β-پینن به α-پینن به میزان 0/133 درصد صورت گرفته است(شکل 6).

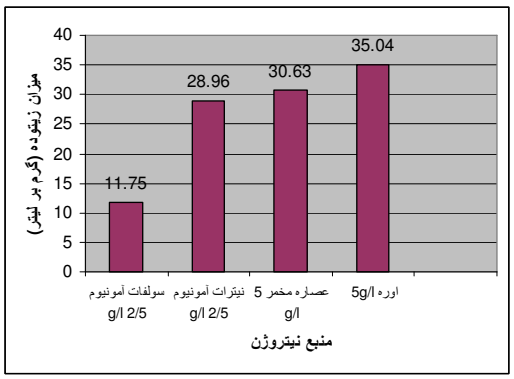


شکل6- تاثیر غلظتهای مختلف گلیسرین بر تولید آلفا-پینن (ºC 37 ، 150 rpm ، pH 6 ، 22 h ، زیتوده حاصل از هر یک از غلظتهای گلیسرین)

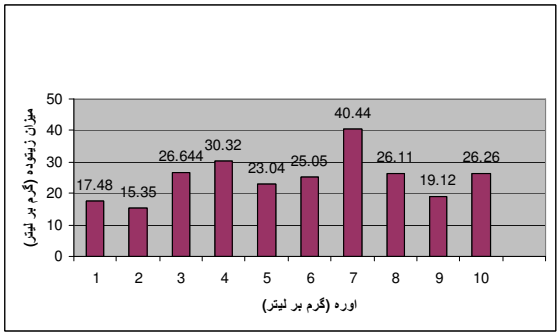
بررسی اثر منابع مختلف نیتروژنی بر رشد جدایه باکتریایی: به منظور بررسی تأثیر منبع نیتروژنی ، چهار نوع منبع نیتروژن شامل 2/5 گرم بر لیتر نیترات آمونیوم ، 2/5 گرم بر لیتر سولفات آمونیوم ،5 گرم بر لیتر اوره و 5 گرم بر لیتر عصاره مخمر انتخاب شدند. میزان تولید زیتوده در حضور منابع نیتروژنی ذکر شده اندازگیری گردید.

بیشترین زیتوده در حضور اوره به عنوان منبع نیتروژن به میزان 35/04 گرم بر لیتر تولید شد. لازم به ذکر است که اوره قبل از افزودن به محیط کشت توسط فیلتر استریل می شد. این آزمایش با سه بار تکرار انجام شد. شکل 7 میانگین تولید زیتوده در حضور منابع نیتروژن مختلف را نشان می دهد.

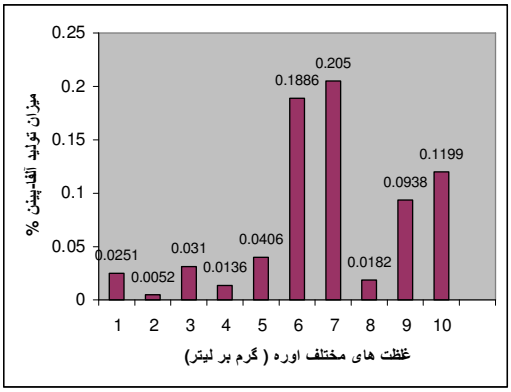
بررسی اثر غلظتهای مختلف اوره بر رشد جدایه باکتریایی: بدین منظور محیط کشت کمپلکس حاوی غلظتهای مختلف اوره (1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5، 6 ، 7 ، 8 ، 9 ، 10 گرم در لیتر) تهیه گردید. اوره قبل از افزودن به محیط کشت جداگانه توسط فیلتر استریل، سپس به محیط کشت استریل افزوده شد. میزان تولید زیتوده در حضور غلظتهای مختلف اوره اندازگیری شد. نتایج شکل 8 نشان داد که در حضور 7 گرم در لیتر اوره بیشترین زیتوده به میزان 40/44 گرم در لیتر تولید شد.



شکل7- میانگین تولید زیتوده در حضور منابع مختلف نیتروژن (ºC 37 ، 100 rpm ، pH 6/8 ، 54 h ، منبع کربن (گلیسرین با غلظت 20 گرم در لیتر)



شکل8- میانگین تولید زیتوده در حضور منابع مختلف اوره (ºC 37 ، 100 rpm ، pH 6/8 ، 54 h منبع کربن (گلیسرین با غلظت 20 گرم در لیتر)



شکل9 - تأثیر غلظتهای مختلف اوره بر تولید آلفا-پینن (37 ºC، 150 rpm، pH 6، 22 h، زیتوده حاصل از هر یک از غلظتهای اوره)

بررسی اثرغلظتهای مختلف اوره برتبدیل β-پینن به α-پینن: به منظور سنجش اثر غلظتهای مختلف اوره بر تبدیل β- پینن به α- پینن زیتوده حاصل از این غلظتها وارد واکنش دگرگونی بیولوژیکی شد. بنابراین منظور آزمون دگرگونی بیولوژیکی با شرایط pH برابر 6 و 150rpm 100 µl از β- پینن و به مدت زمان 22ساعت درحضور یک گرم زیتوده (حاصل ازغلظتهای مختلف اوره و 20 گرم بر لیتر گلیسرین) در دمای 37 درجه سانتی گراد انجام گرفت. محصولات حاصل از هر یک از این واکنشها استخراج و توسط دستگاه GC آنالیز گردید. تمام فاکتورهای محیط کشت می توانند بر سرعت رشد و تولید زیتوده (بیومس) در انتهای زمان 54 ساعت مؤثر بوده و زیتوده تولید شده در محیط کمپلکس در حضور زیتوده حاصل از 7 گرم در لیتر اوره بیشترین تبدیل β- پینن به α- پینن برابر با 0/2005 درصد نشان داد (شکل 9).

از آنجا که محیط واکنش تجزیه و تبدیل بیولوژیکی در تمام مراحل شامل میزان یکسانی زیتوده (یک گرم بر لیتر) می باشد تنها اختلاف واکنش تجزیه و تبدیل بیولوژیکی در حالت فیزیولوژیکی زیتوده حاصل از سویه باکتریایی است که با میزان مختلفی از منابع کربن و نیتروژن رشد کرده است.

به این ترتیب این پژوهش نشان داد که اختلاف در غلظت منابع کربن و نیتروژن نه تنها بر رشد سویه باکتریایی ، بلکه بر مسیر متابولیسمی نیز مؤثر بوده است و اثرات مختلفی بر رشد سویه و نیز فعالیت کاتابولیکی آن داشته است.

بحث

تاکنون تحقیقات زیادی در رابطه با واکنشهای تجزیه و تبدیل بیولوژیکی اترهای روغنی صورت گرفته است که باکتریها، قارچها و حتی اسپورهای قارچی به عنوان بیوکاتالیزور عمل کرده اند و از چنین ترکیباتی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده و حتی با ایجاد تغییرات درون ملکولی ساختار آنها، ترکیبات جدیدی تولید شده است.

از آنجا که امروزه مصرف کنندگان نسبت به مواد غذایی که از طریق شیمیایی تولید می شوند نظر مثبتی ندارند تلاش برای تولید طعم دهنده های طبیعی حائز اهمیت گردیده است. سازمان معتبر EEC Legislation فرآورده هایی که توسط سلولهای زنده یا آنزیمهای آنها از منابع طبیعی تولید می شوند به عنوان ترکیبات طبیعی ثبت کرده است . طبق استانداردهای تعریف شده در آمریکا طعم دهنده های طبیعی، اترهای روغنی، اولئورزین ها، اسانسها و شیرابه هایی که حاصل از تقطیر برگ و سایر اجزای گیاهان هستند جزء طعم دهنده های طبیعی محسوب می شوند (2).

جدول استاندارد مواد افزودنی اروپایی (European guidline) ترکیبات آروماتیکی که از طریق فیزیکی، آنزیماتیک، فرآورده های میکروبی و یا فرآیندهای آماده سازی غذاهای سنتی تولید می شوند را جزء ترکیبات طبیعی دسته بندی می نماید (1 و5) .

موادی که بوسیله دگرگونی های میکروبی مواد خام طبیعی توسط آنزیمها یا میکروارگانیسم ها تولید می شوند جزء مواد طبیعی دسته بندی و از نظر تجارتی نیز با ارزش هستند و برای صنعت طعم دهنده و خوشبوکننده از اهمیت

ویژه ای برخوردار می باشند. بنابراین تولید طبیعی این ترکیب بسیار حائز اهمیت است.

بنا به تغییر و تحولات سیاسی و اقتصادی در دهه 80 میلادی، تأمین اترهای روغنی به ویژه α- پینن از طریق صمغ گیاه باریجه برای صنعت اسانس با مشکلاتی روبرو بوده است. همزمان با این رویداد، شرکت های تولید کننده اسانس مثل شرکت بایر آلمان سنتز شیمیایی α- پینن را که از نظر مصرف بسیار مهمتر از β- پینن است با موفقیت انجام دادند. اما خواص کاربردی و فیزیکی و شیمیایی α- پینن سنتزی مشابه α- پینن طبیعی نمی باشد. به طوری که صنعت اسانس همچنان به دنبال دستیابی به α-پینن طبیعی و استفاده این محصول گران قیمت در فرآورده های نهایی است. زیرا منابع طبیعی که عموماً گیاهان می باشند دستخوش تغییرات طبیعی به طور مثال تغییرات آب و هوایی و غیره قرار می گیرند.

امروزه تغییرات و دگرگونی میکروبی که محصولات آنها ترکیبات طبیعی تعریف می شوند راه جدیدی برای تولید اسانسهای طبیعی محسوب می گردد که در سالهای اخیر در صنعت اسانس بسیار مورد توجه قرارگرفته است.

کمپانیهای تولید اسانس امروزه قسمت اعظم واحدهای تحقیق و توسعه خود را اختصاص به راه اندازی این واکنش داده اند با این وجود که α- پینن سنتزی همچنان مورد استفاده قرار می گیرد اما برای دستیابی به محصول نهایی مورد پسند صنعت اسانس مبزان قابل توجهی α- پینن طبیعی نیز به محصول اضافه می شود.

در این پژوهش از سلولهای در حال استراحت استفاده شد زیرا جدایه های انتخاب شده در این تحقیق از محیطهای اکولوژیکی جدا سازی شده که اترهای روغنی بطور طبیعی حضور دارند و احتمال حضور میکروارگانیسم هایی که با این شرایط اکولوژیکی خود را تطبیق داده باشند زیاد است. و بدین ترتیب شانس دستیابی به میکروارگانیسم هایی که قادر به انجام واکنشهای دگرگون سازی بیولوژیکی باشند بسیار قوی به نظر می رسید. بنابراین دیگر نیازی به القای آنزیمهای دگرگون کننده بیولوژیکی نیست و در نتیجه استفاده از سلولهای در حال رشد و القای آنزیمها ضروری بنظر نمی رسد. استفاده از سلولهای در حال رشد ، به دلیل آلودگی آنها در حین واکنش چندان مناسب نیست. زیرا آلودگی می تواند واکنشهای مفید را متوقف و موجب تشکیل محصولات معیوب و ناخواسته و یا تخریب کلی سوبسترا شود.

مزیت استفاده از سلولهای در حال سکون، عدم بازدارندگی رشد توسط سوبسترا ، راحتی کار کردن با این سلولها و جمع آوری آسان محصول می باشد زیرا هنگام کار کردن با این سلولها برخلاف سلولهای در حال رشد، محیط کشت که سبب مشکلاتی در جمع آوری محصول می گردد حضور ندارد همچنین کنترل متابولیت های ثانویه غیر دلخواه و یا واکنشهای جانبی با سلولهای در حال استراحت راحت تر است. سلولهای در حال استراحت نسبت به آنزیمهای ایزوله شده نیز مزایایی دارند زیرا سلولهای در حال استراحت قادرند واکنشهای چند مرحله ای را انجام دهند بدون اینکه به کوآنزیم گران قیمتی نیاز باشد.

انتخاب محیط کشت مناسب در تولید فرآورده های میکروبی به اندازه سویه مناسب دارای اهمیت است. زیرا محیط کشت، مواد مغذی جهت رشد، تولید انرژی و بیوسنتز فرآورده های بیولوژیکی را فراهم می سازد. از آنجا که قسمت اعظم ساختمان میکروبی از فرآورده های حاصل از کربن و نیتروژن تشکیل شده لذا منابع کربن و نیتروژن در مقایسه با سایر مواد در محیط کشت از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند (4 و10).

درافزایش تولید یک فرآورده، مهم این است که مقادیر بیشتری از منابع ازت و کربن درگیر مسیرهای متابولیکی یک میکروارگانیسم شوند. باید به این نکته نیز توجه داشت محیط کشتی که جدایه، بالاترین رشد و تکثیر را دارد الزاماً مناسب ترین محیط جهت تولید فرآورده های

میکروبی نیست وگاهی میزان فرآورده های میکروبی درمحیطی که رشد میکروارگانیسم ازحداقل مقدار بر خوردار است بیشتر می باشد. زیرا مقادیر زیادی از مواد غذایی به ویژه منابع کربنی ونیتروژنی به جای اینکه صرف رشد و ساخت اجزای سلولی شوند درگیر مسیرهای متابولیکی سازنده فراورده های میکروبی می گردند (4 و 7) .

بنابراین افزایش تولید زیتوده به این معنا نیست که فرآورده های میکروبی نظیرآنزیم مورد نظر (آنزیم تبدیل کننده β – پینن به α–پینن) نیز به میزان بیشتری سنتز شده باشد. ازآنجا که هدف ازاین پژوهش شناسایی وانتخاب شرایط مناسب برای تبدیل β –پینن بهα– پینن است لذا ضروری به نظرمی رسد که درحضور زیتوده حاصل ازغلظتهای مختلف منابع کربنی، میزان تبدیل β – پینن به α–پینن نیزسنجیده شود. پیرو نتایج به دست آمده، غلظت بهینه منبع کربن (گلیسرین)، 20 گرم در لیتر بوده و زیتوده حاصل از این غلظت توانسته واکنش دگرگونی بیولوژیکی را نسبت به دیگر غلظتهای کربنی بهتر انجام دهد و راندمان واکنش دگرگون سازی بیولوژیکی در حضور زیتوده حاصل از غلظت بهینه منبع کربن (گلیسرین) ، 20 گرم در لیتر بیشتر بوده است. لازم به ذکر است که طبق شکل 3 راندمان واکنش دگرگونی بیولوژیکی (میزان تولید آلفا–پینن) در حضور زیتوده های حاصل از غلظتهای 5، 10، 15 و 30 ناچیز و حتی صفر گزارش شده است که می تواند دلایل مختلفی داشته باشد مثلاً امکان دارد در حضور این غلظتها سنتز آنزیم متوقف شده و یا اینکه آنزیم مورد نظر سنتز شده و واکنش دگرگون سازی نیز انجام شده باشد اما شکستن سلول و یا استخراج محصولات واکنش بخوبی انجام نگرفته است.

مطالعه کشت میکروارگانیسم ها نشان داد که غلظتهای منبع کربن در محیط کشت علاوه بر رشد سلول بر مسیرهای متابولیسمی نیز تأثیر دارد. به عبارت دیگر در حضور غلظتهای کمتر و بیشتر از 20 گرم در لیتر میزان تولید آنزیم تبدیل کننده β – پینن به α–پینن کمتر است.

از آنجا که غشای سلولهای میکروبی همانند سد محکمی در برابر عبور و مرور مواد بین داخل و خارج سلول میکروبی و محیط کشت است لذا چندین روش برای افزایش سرعت عبور و مرور مواد بین سلول و محیط کشت وجود دارد. از جمله این روشهای فیزیکی که به طور مؤثر برای شکست سلولهای میکروبی به کار می رود سونیکاسیون است که روش مناسبی برای شکست سلولهای میکروبی در مقیاس آزمایشگاهی محسوب می شود. هدف اصلی این پژوهش پیدا کردن جدایه ای بوده که قادر به تبدیل β–پینن به α–پینن باشد که پس از تحقیقات یک سویه باکتریایی (میکروکوکوس *Micrococcus sp.strain PIN*) با این توانایی جدا سازی گردید که آزمایشات بهینه سازی باتوجه به کمبود امکانات انجام گرفت. از آنجا که تاکنون در هیچ منبع علمی تبدیل بیولوژیکی β–پینن به α–پینن گزارش نشده بود برای اولین بار نتایج این پژوهش نشان داد که این واکنش قابل راه اندازی می باشد.

این تحقیق با توجه به محدود بودن امکانات و تأمین دشوار سوبسترا و محصول در محدوده بسیار کم انجام گرفته است ولی مطمئناً آزمایشات بهینه سازی بویژه بهینه سازی واکنش دگرگونی بیولوژیکی توجیه اقتصادی دارد و راه اندازی تولید α–پینن از این طریق (بیولوژیکی) در صنعت اسانس بسیار مهم و قابل اجرا است. هدف این تحقیق اثبات اهمیت دگرگونی بیولوژیکی بوده است که یک شاخه بسیار مهم از زیست فن آوری محسوب می شود و اخیراً در ایران بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

شاید با توجه به ابزارهای مورد نیاز مانند تأمین مواد اولیه ، انواع صمغ ها و عصاره گیاهی و دارویی و غیره بتوان ادعا کرد که در ایران این شاخه از بیوتکنولوژی نسبت به شاخه های دیگر خیلی زودتر قابل راه اندازی باشد.

تشکر و قدردانی: از گروه زیست شناسی دانشگاه الزهرا که امکان انجام این پژوهش را فراهم آوردند بی نهایت سپاسگزاری می گردد. همچنین از جناب آقای دکتر رحیم حکمت شعار مدیر گروه محترم شیمی دانشگاه الزهراء که امکان استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی را در این پژوهش فراهم آوردند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1- Berger, R.G. (1995)." Aroma Biotechnology". Springer-Verlag, Berlin, pp. 4, 36, 38, 81-87.

2- Ebner, H. and Follmann H. (1988). "Biotechnology".Verlachemie ,Weinhim.3.

3-Lindmark Henriksson Marica. (2003). Biotransformation of terpentine constituents oxygenation and Esterification". Doctoral Thesis.

4-Murry, M.Y. (1985)." Comprehensive Biotechnology." Peragmon.3.830-833.

5-Onken, J. and Berger.R.G. (1999)." Effects of R-(+)-limonene on submerged culture of the terpene transforming basidomycete *Pleurotus Sapidus*." Journal Biotechnology .69,163-168.

6- Ohloff G. (1994)." Scent and Fragrances." Springer – Verlag: Berlin

7- Rehm , T.J. (1986)." Biotechnology" . VCH. 1: 7.

8- Stvadia, A., Kent Brown S. and Mathhew J.G. (2003)."The Journal of the student society for ancient studies". Brigham Young University Provo , Utah , Volume 2 , Number 2.

9- Sayyah, M., Kamalinejad .M, Bahrami Hidage.R. and Rustaiyan A. (2001)." Antiepileptic potential and Composition of the Fruit Essential Oil of Ferula Gummosa boiss".Iranian Biomedical Journal. 5(2 & 3),69-72.

10- Sikyta , B. (1983)." Methods in industrial Microbiology." Ellis horwood limited John Willey and Sons . 145-175.

11- Vanderhaege,B. Neven.H. Cogghe.S. Verstrepen . K.J. Derdelinckx.G. and Verachtert.H.(2003). „Bioflavoring and beer refermentation ". Applied Microbiology Biotechnology,62,140-150.

12- Zargari,A. (1989)." Medicinal plants" . Tehran University press .Tehran . Iran . 2 : 598-602.

Screening of microorganism capable of transforming β-pinene to α-pinene from *Ferula galbanum Boiss* and galbanum gum

Jookar Kashi F.[1], Fooladi J.[1] and Bayat M.[2]

[1]**Department of Biology, School of Science, Al-zahra University, Vanak, Tehran, Iran**

[2]**Department of Science & Research, Islamic Azad University,Tehran,Iran**

Abstract

In the present study, microorganisms were isolated by screening methods from *Ferula galbanum Boiss* , galbanum gum and surrounding terpene soaked soils which are nature source of oily ethers. Twenty four microorganisms (15 fungi, 9 bacteria) were isolated. Microorganisms were tested for their ability to produce α-pinene in the present β-pinene. The biotransformation medium involved, 100 ml buffer phosphate (Na_2HPO_4, NaH_2PO_4), pH 6, 100 µl β-pinene, and 1g biomass, 37 ° C, 150rpm and 22 h. Biotransformation products were extracted with n-hexan and analyzed by gas chromatography. One bacterial isolated capable of forming β-pinene to α-pinene. The growing conditions i.e. carbon source and nitrogen source were optimized.The maximum cell density were 33.59 g l^{-1} and 40.44 gl^{-1} in presence of 30 g l^{-1} glycerin as carbon source and 7 gl^{-1} urea as nitrogen source, respectively.The biotransformation rate was improved under optimal conditions.The maximum α-pinene were formed as 0.133% and 0.205 % with 20 g l^{-1} glycerin and 7 g l^{-1} urea were applied as carbon and nitrogen sourses , respectively.

Keywords: Natural essence, Ferula galbanum gum, Biotransformation, β-pinene, α-pinene