مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال پنجم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، صفحات ۱۶-۹

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

مراحم آشنگرف[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 زیست‌تبدیلی 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، پروستاگلاندین‌ها، انواع آنتی‌بیوتیک‌های خاص، نگهدارنده‌های غذایی و انواع ترکیبات معطر اشاره کرد. وانیلین یا ۴-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزآلدئید با فرمول بسته $C_8H_8O_3$ از مهم‌ترین ترکیبات معطرآروماتیک 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 (۴، ۳).

در حال حاضر، مصرف جهانی وانیلین بیش از ۳۰۰۰۰ تن درسال 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 هرکیلوگرم است (۶، ۵) و دیگری وانیلین طبیعی که از طریق استخراج الکلی از دانه‌های گیاه *Vanilla planifolia*

Archive of SID
www.SID.ir

تهیه می‌شود و قیمت تمام شده آن حدود ۱۲۰۰ تا ۴۰۰۰ دلار به ازای هرکیلوگرم 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). درحال 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 (۱۱-۹)، وانیلیک اسید (۱۲)، اوژنول (۱۳) و ایزواوژنول (۱۷-۱۴) به وانیلین با استفاده از میکرواورگانیسم‌های 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 (۱۹، ۱۸) 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 میکرواورگانیسم‌ها مانند: *Aspergilluis niger*، *Serattia*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus fusiformis*، *Rhodopcoccus rhodocourous* و *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas chlororaphis* می‌توانند ایزواوژنول را به وانیلین تبدیل کنند (۱۶، ۱). با توجه به اینکه وانیلین به عنوان یک حد واسط 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 ۰/۰۸ 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 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 chlororaphis* 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 استیرر (هیدولف، آلمان)، Rotary evaporator (Heidolph, Germany) ، Transilluminator (UVp, TS-36, U.S.A) ، اتوکلاو، شیکر دورانی (orbital incubator S150, Stuart Scientific)، و لوازم معمولی آزمایشگاهی.

Archive of SID
www.SID.ir

سویه‌ها و شرایط کشت: ۲۴ سویه باکتری از خاک‌های جمع‌آوری شده ازمزارع، 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):
$(NH_4)_2SO_4$ ۰/۲، $CaCl_2.2\ H_2O$ ۰/۰۲، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۰۵، $FeSO_4.7H_2O$ ۰/۰۰۲۵، KH_2PO_4 ۰/۰۳، $Na_2HPO_4.12H_2O$ 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 ازطریق پالایه‌های غشایی (میلی پور) با قطرسوراخ ۲۲/. میکرونی به آن اضافه شد.

غربال‌گری سویه‌های با قابلیت تحمل‌پذیری 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 ۲۰ml ازنوترینت 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 فرمامید (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،۳۵، ۴۰،۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵ ، ۷۰ ، ۷۵و ۸۰ برای ایزواوژنول و ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ میلی مولار 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 درآن رشد کرده بود(رشد لگاریتمی) و تراکم آن ۰/۵ مک فارلند بود روی محیط آگاردار قرار گرفت (میکروب تلقیح شده$10^8 \times 1/5$ cfu/ml). پلیت ها پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۰°C در ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ مورد مطالعه قرار گرفتند.

غربال‌گری 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):

Glucose۰/۵, Yeast extract ۰/۰۵, $(NH_4)_2SO_4$ ۰/۲, $CaCl_2.2\ H_2O$ ۰/۰۲, KH_2PO_4 ۰/۰۳, $Na_2HPO_4.12H_2O$ ۰/۱۵, $MgSO_4.7H_2O$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. فازکلروفرمی 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.

زیست‌تبدیلی 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 درفواصل زمانی مختلف برداشت و سانتریفوژ شد (۳۵۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه). سپس از مایع رویی برای تعیین غلظت وانیلین تشکیل شده درمخلوط واکنش از طریق استخراج با محلول بی‌سولفیت سدیم اشباع و 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 ازکشت ۲۴ ساعته با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (میکروب تلقیح شده$10^8 \times 1/5$ cfu/ml) تهیه

Archive of SID

www.SID.ir

کرده و ۵ml/. بـه محـیط بیوترانـسفورماسیون طراحـی شـده (GY) حـاوی غلظـت‌هـای مختلـف از ایزواوژنـول (۲۵ml در ارلن‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری) تلقیح شده و در دمـای ۳۰°C در شـیکر چرخـشی (۱۵۰ rpm) بـه مـدت ۱۲۰ سـاعت گرمخانه‌گذاری شد.

در فواصل زمانی مشخص، مایع رویی را جدا کرده، ابتدا به وسیله محلول اسید سولفوریک ۱۰ نرمـال بـه دقـت اسـیدی کرده سپس هم حجم آن کلروفـرم اضـافه شـد. فـازکلروفرمی ازفاز آبی به وسیله قیف جداکننده جدا شد. فاز آبی دوباره بـه وسیله کلروفرم شست و شو داده شد. این عمـل ۵ بـار تکـرار شد. به محلول کلروفرم جمع آوری شده، به میـزان ۲/۵ برابـر حجم آن ، محلول بی سولفیت سدیم اشباع افزوده شد. سپس مخلوط حاصله در یـک بـالن ریختـه شـد و درون آن همـزن مغناطیسی انداخته شد. پس از ۳۰ دقیقه فـاز کلروفرمـی بـه وسیله قیف جدا کننده از فاز آبی جدا شد. فاز آبی دوبـاره بـه وسیله کلروفرم شست و شو داده شد. این عمـل ۳ بـار تکـرار شد. سپس زیر هود به میزان حدود یک پنجم فاز آبی، محلول اسید سولفوریک ۵۰٪ اضافه شد. محلول حاصـله درون حمـام آب قرار گرفت تا حباب‌هـای گـاز SO_2 خـارج شـوند. در ایـن حالت، وانیلین به شکل آزاد خود وارد فـاز آبـی شـد و سـپس وانیلین موجود در فاز آبی به وسیله اتر استخراج شـد. پـس از تبخیر اتر، وانیلین استخراجی در اتانول ۵٪ حل شده و سپس بر اساس روش پیشنهادی AOAC مبنی بر هیدرولیز وانیلـین با NaOH (۱./ نرمال) و اندازه‌گیری جذب آن در ۳۴۸ نانومتر، ابتدا منحنـی جـذب اسـتاندارد ترسـیم شـد و سـپس از روی معادله خط به دست آمده، غلظت وانیلین درمخلـوط واکـنش تخمین زده شد (۲۳).

شناسایی وانیلین: جهت شناسایی وانیلـین از روش TLC در حضور وانیلین استاندارد و فاز متحرک n-هگزان: اتیل اسـتات (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 بـالا بـا قابلیت تبدیل ایزواوژنول به وانیلین: با توجـه بـه سـمیت سوبسترا (ایزواوژنول) و محصول (وانیلـین) روی سـلول‌هـای باکتریایی، شناسایی باکتری‌های تحمل‌پذیر بـه غلظـت‌هـای بـالای ایزواوژنـول و وانیلـین، قـدم اول در جهـت انتخـاب سویه‌هایی است که قادر به تجزیه ایزواوژنول و تبدیل آن بـه وانیلین هستند و مـی‌تواننـد در انتخـاب سـویه برتـر جهـت بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین مفیـد باشـند(۲۲). در این راستا ۲۴ سویه باکتری از خاک‌های منـاطق مختلـف ایران بر اساس تکنیک غنی سازی جدا شدند. تحمل‌پـذیری ذاتی این سویه ها نسبت به ایزواوژنول و وانیلـین بـه وسـیله روش رقت در آگار تعیین شد (جدول ۱).

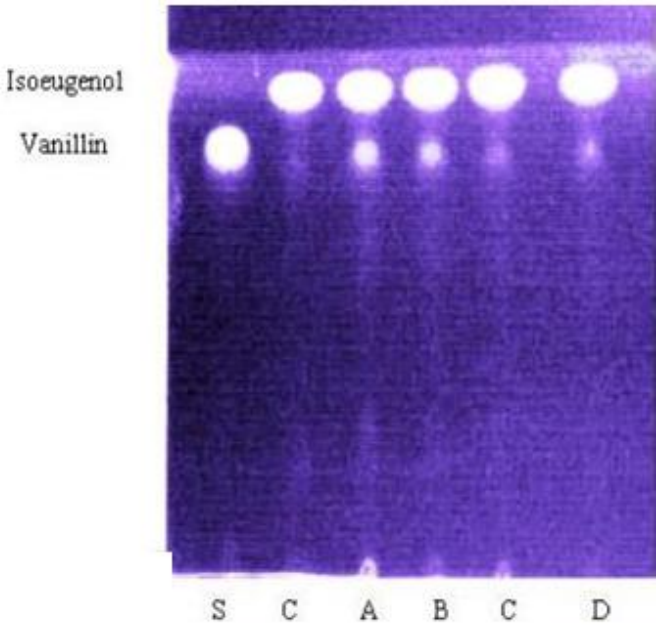
جدول ۱- الگوی تحمل پذیری به ایزواوژنول و وانیلین (بر حسب میلی مولار) در سویه‌های باکتریایی جدا شده از خاک‌های مناطق مختلف ایران

سویه باکتری	ایزواوژنول ($C_{10}H_{12}O_2$)	وانیلین ($C_8H_8O_3$)
KOA1	>۸۰	>۴۰
KOA18	۷۵	۳۵
IMPA21	۷۰	۳۵
IDA16	۶۵	۳۰
سایر ۲۰ سویه	<۵۵	<۲۵

از بین ۲۴ سویه بـاکتری جـدا شـده، ۴ سـویه بـاکتری (KOA1، KOA18، IMPA21 و IDA16) کـه بـالاترین تحمل‌پذیری را نسبت به ایزواوژنول و وانیلین از خـود نـشان دادند (بالاتر از ۱۰g/l برای ایزواوژنول و ۵g/l بـرای وانیلـین) انتخاب شدند و جهت سنجش قابلیت تبدیل ایزواوژنـول بـه وانیلین مورد آنالیز TLC قرار گرفتند (شکل۱). همـان گونـه کـه در شـکل نـشان داده شـده، سـویه KOA1 (Lane A) بیشترین مقدار وانیلین را تولیـد کـرده اسـت. ایـن سـویه از خاک جمع آوری شده از مزارع کـشت ریحـان در کردسـتان جدا شد. سـویه KOA1 یـک بـاکتری گـرم منفـی، میلـه‌ای شـکل، غیـر اسـپوردار، متحـرک و تولیـد کننـده کاتـالاز و اکسیداز بـود. براسـاس مطالعـات فنـوتیپی، فیزیولـوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی متعدد و همچنین مطالعه ویژگی‌هـای این باکتری با سایر باکتری‌های شناخته شده می‌توان به طور موقت سویه KOA1 را در جنس *Pseudomonas* طبقه‌بندی کرد (داده‌ها نشان داده نشده است).

Archive of SID

www.SID.ir



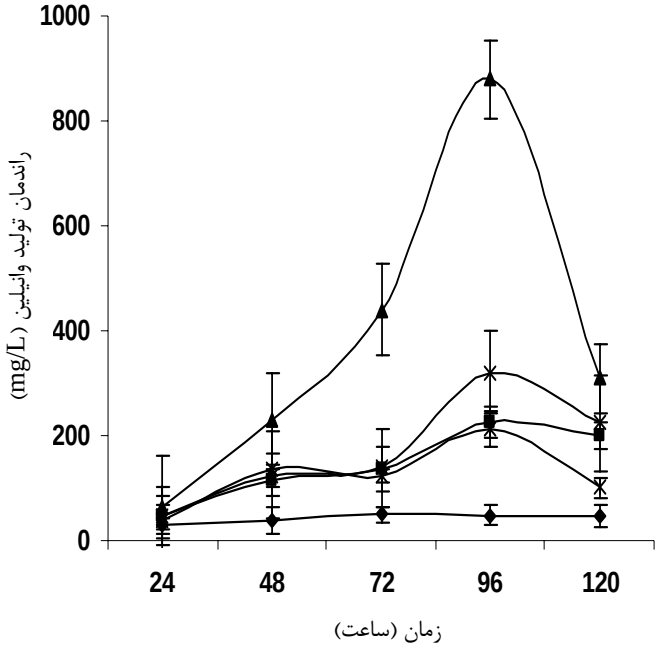
شکل ۱- بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین

S: وانیلین استاندارد ، C: محیط کنترل (حاوی ایزواوژنول و بدون تلقیح باکتری)، A: سویه KOA1 ، B: سویه KOA18، C: سویهIMPA21 ، D: سویهIDA16

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 سلول‌های باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت روی محیط طراحی شده (GY) حاوی ۰/۵٪ گلوکز رشد داده شده و سپس ایزواوژنول در غلظت‌های 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 شکل۲ نشان داده شده بیشترین مقدار وانیلین تولیدی (۸۸۰mg/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 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.

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 Rf یکسان (Rf=۰/۷۴) مربوط به وانیلین استاندارد (a) و وانیلین سنتزی از ایزواوژنول (b) بیانگر حصول وانیلین از ایزواوژنول است (شکل ۳ قسمتA) ، سپس طیف فرابنفش (UV) وانیلین استخراجیِ سنتز شده با طیف فرابنفش وانیلین استاندارد در دامنه ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis گرفته شد (شکل ۳ قسمت‌های C, B) . همان گونه که در شکل نشان داده شده، وجود منحنی‌های مشابه بیانگر حصول وانیلین از ایزواوژنول است.



شکل ۲- اثر غلظت‌های اولیه ایزواوژنول و زمان انکوباسیون روی بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین در سویه باکتری KOA1 در محیط پایه GY . غلظت‌های ایزواوژنول (درصد حجمی/حجمی):(◆) ۰/۱ ، (■) ۰/۵ ،(▲) ۱ ، (✳) ۱/۵ ، (✳) ۲.

نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش و بار معرف ۱± انحراف معیار است.

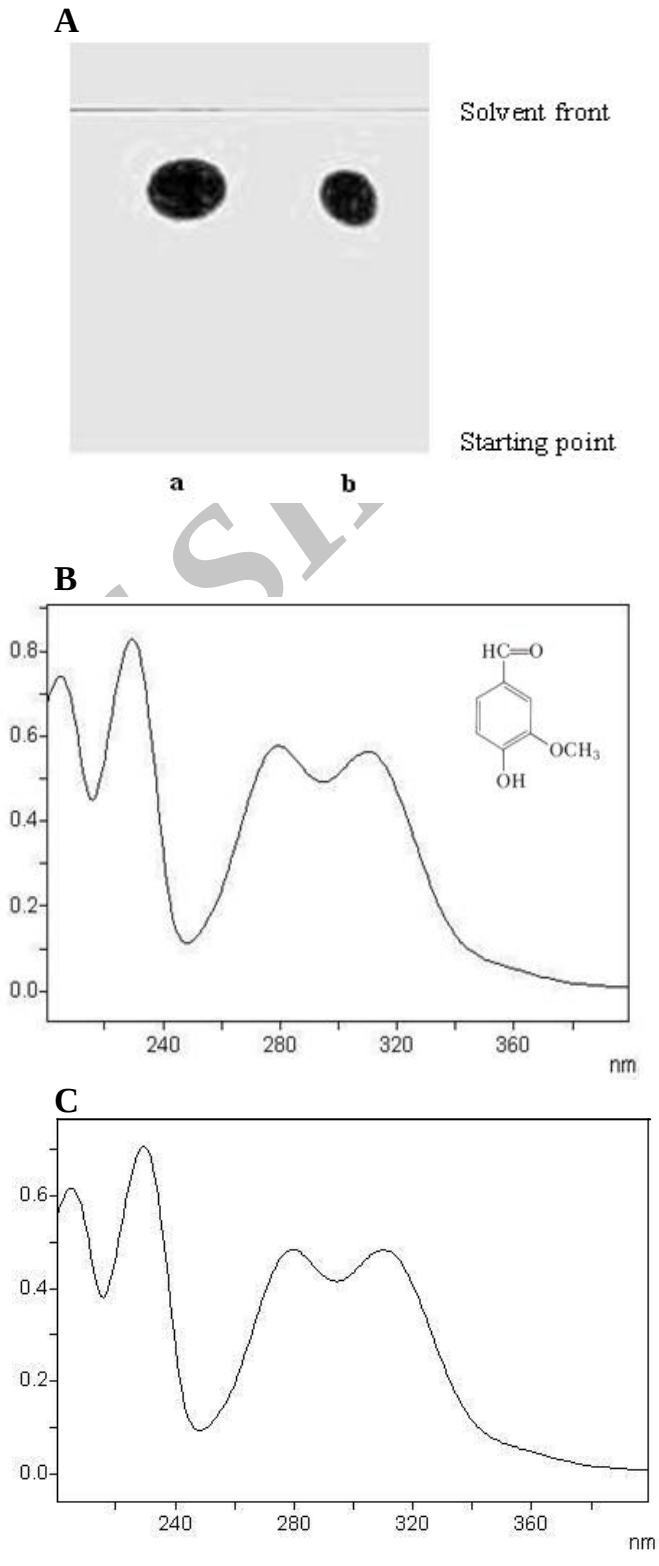
www.SID.ir

• 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 جمع آوری 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

Archive of SID

www.SID.ir

AOAC مورد سنجش قرار گرفته است. همان گونه که در شکل۲ نشان داده شده ، بیشترین میزان وانیلین تولیدی (۸۸۰mg/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 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.

• References

1. Priefert H, Babenhorst J, Steinbuchel A. Biotechnological production of vanillin. Appl Microbiol Biotechnol 2001; 56:296-314.
2. 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.
3. 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.
4. Rao RS, Ravishankar GA. Vanilla flavor: production by conventional and biotechnological routes. J Sci Food Agric 2000; 80: 289-304.
5. Clark GS. Vanillin. Perfum Flavour1990; 15: 45-54.
6. Hagedorn S, Kaphammer B. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. Annual Rev Microbiol 1994; 48: 773-800.
7. 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.
8. Walton NJ. Molecules of interest: vanillin. Photochemistry 2003; 63: 505-515.
9. 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.
10. Karmakar B, Vohra RM, Nandanwar H, Sharma P, Gupta KG ,Sobti RC. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*.J Biotechnol 2000; 80:195-202.
11. Mulheim A, Muller B, Munch T , Wetli M; inventors. Microbiological process for producing vanillin. US patent 6235507. May 22, 2001.
12. 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.
13. Rabenhorst J, Hopp R; inventors. Process for the preparation of vanillin. US patent 5017388. May 21, 1991.
14. Markus PH, Peters ALJ, Roos R; inventors. Process for the preparation of phenylaldehydes. European patent EP542348. July 7, 1992.
15. Shimoni E, Ravid U , Shoham Y. Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. J Biotechnol 2000; 78:1–9.
16. 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.
17. 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.
18. Müller B, Münch T, Mulheim A, Welti M; inventors. Process for the production of vanillin. European patent EP0885968. December 6, 1998.
19. Rabenhorst J, Hopp R; inventors. Process for the preparation of vanillin and suitable microorganisms. European patent EP0761817. August 7, 1994.
20. 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.
21. Abraham WR, Arfmann HA, Stumpf S, Washausen P, Kieslich K (1988) Microbial transformations of

Archive of SID
www.SID.ir

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.

Archive of SID

www.SID.ir