استفاده از سلولهای در حال استراحت *Halomonas salina* HSL5 به عنوان زیست واکنشگر برای تولید بیولوژیک اسید وانیلیک

مراحم آشنگرف*[۱] و ایرج نحوی[۲]

[۱] **سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی**

[۲] **اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی**

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۱

چکیده

گرایش جوامع بشری برای مصرف فرآورده های آروماتیک طبیعی با ارزش مانند وانیلین و اسید وانیلیک، موجب ترغیب محققین در استفاده از زیست واکنشگرهای میکروبی برای سنتز این محصولات گردیده است. هدف از پژوهش اخیر، غربالگری سویه های باکتری نمک دوست نسبی با قابلیت تجزیه سوبسترای اسید فرولیک و بررسی امکان تشکیل اسید وانیلیک از واکنش زیست تبدیلی سوبسترای مذکور تحت شرایط سلولهای در حال استراحت بود. در این راستا، در یکسری آزمایشات غربالگری ۲۲ سویه باکتری نمک دوست نسبی از محیطهای نمکی مختلف در ایران جدا گردید. غربالگری اولیه با استفاده از آنالیز کیفی HPLC انجام شد. سویه های منتخب از نظر صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و همچنین فیلوژنی و مولکولی شناسایی و تعیین توالی شدند. غلظت اسید وانیلیک و دیگر متوکسی فنلهای تولید شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی به وسیله آنالیز کمی HPLC مورد سنجش قرار گرفت. براساس آنالیز HPLC، سلولهای در حال استراحت سویه باکتری نمک دوست نسبی *Halomonas salina* HSL5 (با شماره دسترسی JQ327041 در بانک اطلاعات ژنی NCBI) دارای بیشترین تولید اسید وانیلیک (397 میلی گرم در لیتر با راندمان مولی ۴۶/۸ درصد) پس از ۲۴ ساعت واکنش، تحت شرایط بهینه نشده بود. مطالعه اخیر نخستین گزارش از زیست تبدیلی میکروبی اسید فرولیک به اسید وانیلیک در گونه باکتری *Halomonas salina* است.

واژه های کلیدی: زیست تبدیلی میکروبی، اسید فرولیک، اسید وانیلیک، *Halomonas salina* HSL5

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۷۱۶۶۲۴۱۳۳ ، پست الکترونیکی: m.ashengroph@uok.ac.ir

مقدمه

استفاده از قابلیت میکرواورگانیسم ها و آنزیمها در تبدیل مواد کم ارزش به مواد با ارزش افزوده بالا و یا تبدیل مواد سمی به غیرسمی از اهداف مهم فرآیندهای بیوتکنولوژی است. این فرآیندها را که در طی آن ترکیبات با استفاده از منابع میکروبی، گیاهی یا آنزیمی به ترکیبات دیگر تبدیل می شوند را زیست تبدیلی می گویند. منظور از زیست تبدیلی میکروبی، استفاده از سلولهای کامل میکروبی (سلولهای رویشی، سلولهای در حال استراحت و اسپورها) یا آنزیمهایشان به عنوان زیست واکنشگر برای تبدیل پیش سازهای طبیعی به ترکیبات طبیعی با ساختار مشابه اما با ارزش افزوده بالا می باشد. در واقع میکرواورگانیسم ها به عنوان زیست واکنشگر قادر به ایجاد ترکیبات شیمیایی خاص و با ارزش از طریق حذف، اضافه نمودن و یا اصلاح استخلافهای عاملی در جایگاههای مشخصی از سوبستراهای به کار گرفته شده به عنوان پیش ساز می باشند (۱۶). از فرآورده های با ارزش تولیدی از طریق زیست واکنشگرهای میکروبی می توان به تولید اسیدهای آلی از ضایعات قندی، تصفیه فاضلابها و پسابها، تولید

Archive of SID
www.SID.ir

انواع ترکیبات استروئیدی، پروستاگلندین ها، انواع آنتی بیوتیکهای خاص، نگهدارنده های غذایی و همچنین تولید انواع ترکیبات آروماتیک با ارزش اشاره نمود (۱۶ و۳۳). در حال حاضر، روشهای سنتز شیمیایی بیشتر صنایع تولید کننده ترکیبات طبیعی از جمله وانیلین و دیگر متوکسی فنلهای با ارزش به ویژه اسید وانیلیک را به طور قابل توجه ای تحت الشعاع خود قرار داده است. با این حال، با توجه به اینکه سنتز شیمیایی باعث آلودگی زیست محیطی و فقدان اختصاصیت سوبسترایی شده و همچنین استفاده از واکنشگرهای شیمیایی، براساس قوانین تصویبی در اروپا و آمریکا از سوی سازمانهای مسئول نظارت بر فرآورده های بیوتکنولوژیک به ویژه فرآورده های دارویی و غذایی، در بسیاری از صنایع دارویی و غذایی محدود و حتی در مواردی هم ممنوع گردیده است (۲۳ و ۳۳)، بنابراین روند روبه رشد تقاضای مصرف جهانی برای تولید ترکیبات معطر طبیعی به دلیل اطمینان از کیفیت مطلوب و سالم بودن آنها، رو به افزایش است. زیست تبدیلی میکروبی پروپنیل بنزنها به منظور تولید انواع ترکیبات متوکسی فنلی با ارزش، با پتانسیل صنعتی شدن، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. پروپنیل بنزنها شامل انواع مختلفی از سوبستراهای فنلی شامل: اوژنول، ایزواوژنول و اسید فرولیک بوده که به عنوان سوبستراهای طبیعی پیش ساز برای سنتز بیولوژیک ترکیبات آروماتیک طبیعی به کار گرفته شده اند و در حال حاضر بیشترین تحقیقات بر استفاده از این سوبستراها متمرکز شده است. وانیلین و اسید وانیلیک در بین ترکیبات متوکسی فنلی شناخته شده دارای بیشترین مصارف کاربردی در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی- بهداشتی هستند(۳۳). وانیلین (۴- هیدروکسی- ۳- متوکسی بنزآلدئید) از قدیمی ترین مواد گیاهی است که از قدیم به عنوان ماده معطر در تهیه انواع غذاهای مختلف و همچنین برای معطر ساختن انواع نوشیدنیها استفاده شده است. در حال حاضر از وانیلین به طور گسترده در صنایع غذایی، دارویی و پزشکی، آرایشی و بهداشتی استفاده می شود (۲۳). پس از وانیلین، اسید وانیلیک (۴- هیدروکسی-۳- متوکسی بنزوئیک اسید) که ترکیب اکسید شده وانیلین می باشد، مهم ترین ترکیب آروماتیک بوده و تهیه بیولوژیک آن به دلایل زیر از اهمیت تجاری بالایی برخوردار است. از وانیلیک اسید به عنوان یک پیش ساز بالقوه برای سنتز وانیلین طبیعی استفاده می شود (۲۵). با توجه به خواص ضد میکروبی اسید وانیلیک، از این ترکیب به عنوان نگهدارنده غذایی استفاده می شود (۱۲). از دیگر کاربردهای این ترکیب متوکسی فنلی با ارزش می توان به استفاده از آن در سنتز انواع اولیگومرها و پلی استرها نام برد (۸) و همچنین استفاده از اسید وانیلیک دی اتیل آمید در اروپا به عنوان محرکهای روانی و استفاده از ترکیبات ۵- نیترو اسید وانیلیک و ۵-آمینو اسید وانیلیک به عنوان عوامل ضد میکروبی (۲۲) اشاره نمود. اسید فرولیک (۳- (۴- هیدروکسی-5-متوکسی فنیل)-1-پروپینویک اسید) یا اسید کونیفریک با فرمول بسته $C_{10}H_{10}O_4$ از مشتقات هیدروکسی اسید سینامیک موجود در دیواره های سلولی گیاهی بوده که در انواع پسمانده های کشاورزی مانند سبوس گندم و برنج، تفاله چغندرقند و نیشکر و تفاله ذرت به فراوانی یافت می شود. از این ترکیب به عنوان یک سوبسترای تجدیدپذیر ارزان قیمت برای تولید انواع ترکیبات متوکسی فنلی با ارزش استفاده شده است. با توجه به شباهت ساختاری بین اسید فرولیک و مشتقات وانیلینی، زیست تبدیلی میکروبی اسید فرولیک به انواع متوکسی فنلهای با ارزش شامل وانیلین، اسید وانیلیک و ۴-وینیل گایاکول (۴- هیدروکسی-۳- متوکسی استیرن) در طیف وسیعی از میکرواورگانیسم ها شامل *Pseudomonas acidovorans* (۲۹)، *Escherichia coli* (۲۱)، *Alcaligenes paradoxus* (۱۵)، *Amycolatopsis* sp. HR 167 (۲۴)، *Streptomyces setonii* ATCC 39116 (۱۸)، *Pycnoporus cinnabarinus* (۲۰)، *Haematococcus pluvialis* (۳۱)، *Bacillus coagulans* (۱۴)، *Streptomyces halstedii* (۱۰)، *Streptomyces*

Archive of SID

www.SID.ir

sannanensis MTCC 6637 (۱۳) و *Schizophyllum commune* (۳۰) گزارش شده است. با وجود اینکه زیست تبدیلی اسید فرولیک در انواع مختلفی از اورگانیسم ها شامل باکتریها، مخمرها، قارچها و تعداد معدودی از جلبکها، گزارش شده است اما با این وجود در مورد زیست تبدیلی اسید فرولیک به وسیله میکرواورگانیسم های نمک دوست مطالعات نادری صورت گرفته و در این ارتباط تنها می توان به مطالعه Abdelkafi و همکارانش (۱) در مورد زیست تبدیلی اسید فرولیک به اسید وانیلیک در گونه باکتری نمک دوست نسبی *Halomonas elongata* اشاره نمود. در این تحقیق تبدیل بیولوژیک اسید فرولیک به اسید وانیلیک را با استفاده از یک سویه بومی نمک دوست نسبی مورد مطالعه قرار داده و برای اولین بار زیست تبدیلی سوبسترای مذکور به اسید وانیلیک و وانیلین در گونه باکتری نمک دوست نسبی *Halomonas salina* گزارش شد.

مواد و روشها

مواد شیمیایی و دستگاهها: مواد شیمیایی: اسید فرولیک (۹۹ درصد)، اسید وانیلیک (۹۷ درصد)، وانیلین (۹۹ درصد) و وانیلیل الکل (۹۸ درصد) از شرکت سیگما خریداری شد (St. Louis, MO, USA). متانول و تری فلورو استیک اسید با درجه خلوص بسیار بالا مخصوص دستگاه HPLC از شرکت مرک تهیه شد (E.Merck, Darmstadt, Germany). اغلب مواد استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمرآز از شرکت سیناژن تهیه گردید. سایر مواد شیمیایی استفاده شده با درجه خلوص بالا (آنالیتیک) بودند.

دستگاهها: دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مجهز به آشکارساز جذب UV مدل JASCo Pu 980 ساخت کشور آمریکا، دستگاه ترمو سایکلر (PCR) مدل Eppendorf ساخت کشور آمریکا، دستگاه اسپکتروفتومتری مدل UltraSpec 1000 ساخت کشور انگلستان، دستگاه ژل داکیومنت مدل BioRad Gel Doc 1000، انواع سانتریفیوژها و میکروسانتریفیوژها مدلهای Eppendorf و Sigma، انواع شیکرهای دورانی و چرخشی مدلهای INFORS AG CH-4103 و Heidolph Incubator 1000، هود بیولوژیک مدل VLFS-536، تانک الکتروفورز مدل GE 1000.

تکنیک غنی سازی: برای غنی سازی و جداسازی سویه های نمک دوست نسبی با قابلیت تجزیه کنندگی اسید فرولیک، از محیط نمکی پیشنهادی Neito *et al*., 1989 (۱۹) ، با ترکیب زیر استفاده شد (گرم در لیتر): NaCl: 81, $MgCl_2$: 7, $MgSO_4.7H_2O$ 9.6, $CaCl_2$: 0.36, KCl: 2, $NaHCO_3$: 0.06, NaBr: 0.026. به محیط مذکور یک گرم در لیتر کلرید آمونیوم به عنوان منبع ازت اضافه شد. pH محیط کشت قبل از اتوکلاو کردن به حدود ۷ رسانده شد. برای روش غنی سازی، ابتدا سوسپانسیونی از نمونه های جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران (خاکهای شورو پرشور، آبهای شور و پرشور) به عنوان مایه تلقیح به ارلنهای 100 میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر از محیط نمکی ذکر شده که به آنها غلظت مشخصی از اسید فرولیک (۱ گرم در لیتر) پس از استریل کردن از طریق پالایه های غشایی میلی پور با قطر سوراخ ۰/۲۲ میکرونی افزوده شده بود، استفاده شد. نمونه ها از دریاچه خزر، دریاچه قم، دریاچه بختگان فارس، خاک قم، خاک قشم جمع آوری شده بودند. پس از غنی سازی و چندین بار پاساژ متوالی در محیط نمکی مذکور، تنها باکتریهای قادر به رشد بر روی اسید فرولیک باقی می مانند. محیطهای مذکور در دمای محیط بر روی شیکر با دور ۲۰۰ rpm انکوبه شدند. پس از ۳ تا ۵ پاساژ، احتمال اینکه کدورت به دست آمده ناشی از رشد باکتریهای تجزیه کننده اسید فرولیک است، افزایش پیدا می کند. از پاساژهای نهایی به میزان ۲۰۰ میکرولیتر روی محیط LB با غلظت نهایی ۸۰ گرم در لیتر سدیم کلراید حاوی ۰/۱ گرم در لیتر اسید فرولیک پخش شده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای

Archive of SID

www.SID.ir

۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سویه های جدا شده به صورت کلنیهای تک، به محیطهای LB آگار نمکی با غلظت نهایی ۸۰ گرم در لیتر نمک سدیم کلراید، به صورت کشت استریک انتقال داده شدند. سویه های خالص شده به محیطهای اسلنت دار LB آگار نمکی (Casein peptone: 10 g/l, Yeast extract: 5 g/l, NaCl: 80 g/l, Agar Agar 20 g/l , pH 7) جهت آزمایشات بعدی انتقال داده شدند.

غربالگری سویه های نمک دوست نسبی با قابلیت تبدیل بیولوژیک اسید فرولیک به اسید وانیلیک: در این قسمت از تحقیق، از سویه های باکتری نمک دوست نسبی بومی جدا شده در طی مراحل غنی سازی استفاده شد. غربالگری اولیه با استفاده از تکنیک HPLC، به وسیله یک روش دو مرحله ای غربالگری، انجام شد (۲۶). در روش مذکور ابتدا سویه های نمک دوست جدا شده در محیط غربالگری LB نمکی حاوی ۸۰ گرم در لیتر کلرید سدیم به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سوبسترای اسید فرولیک در غلظت نهایی ۱ گرم در لیتر، پس از فیلتراسیون از طریق پالایه های غشایی میلی پور ۰/۲۲ میکرونی، به محیط افزوده شد. مطالعات زیست تبدیلی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، دور شیکر 200 rpm بررسی شد. پس از طی ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری اضافی نمونه ها مورد آنالیز کیفی HPLC قرار گرفتند.

شناسایی فنوتیپی و مولکولی سویه باکتری نمک دوست نسبی HSL5 : ویژگیهای ریخت شناسی و فیزیولوژیک سویه CSW4 در محیط LB مایع یا آگار حاوی ۸ درصد (وزنی/حجمی) سدیم کلراید مورد بررسی قرار گرفت. رنگ آمیزی گرم با استفاده از روش Bruke انجام شد و به وسیله تست KOH (۳ درصد) تأیید گردید (۷). تست حرکت با استفاده از روش قطره معلق انجام شد (Murray *et al.*, 1994). تستهای کاتالاز، اکسیداز، فعالیت اوره آز، احیای نیترات، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز نشاسته و همچنین هیدرولیز توئین ۲۰ و ۸۰ به وسیله روش Simbert and Krieg (۲۷) انجام شد. رشد در دماهای مختلف (۴ تا ۴۲ درجه سانتی گراد) و همچنین غلظتهای مختلف سدیم کلراید (۰ تا ۳۰ درصد) در محیط نوترینت براث (NB) مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین هویت دقیق سویه برتر HSL5، روش تعیین توالی 16S rDNA انجام پذیرفت. پس از استخراج DNA ژنومی به روش فنل–کلروفرم (۱۱)، واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر و با استفاده از پرایمرهای عمومی 8F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و (5′-1541R (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′ انجام شد. واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه برای یک سیکل، واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۰ سیکل، چسبیدن پرایمر به DNA ژنومی در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۰ سیکل، تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه برای ۳۰ سیکل و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای یک سیکل گنجانده شد. جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر که اندازه تقریبی آن حدود ۱۵۰۰ جفت باز است، ۲ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و در کنار استاندارد وزن مولکولی (مارکر1 kb) الکتروفورز گردید. پس از اطمینان از تکثیر، کل محصول PCR را الکتروفورز نموده و بعد از خاتمه الکتروفورز ژل را روی دستگاه ترانس لومیناتور قرار داده و قسمتی که حاوی باند مورد نظر است را با تیغ جدا نموده و پس از تخلیص آن به وسیله کیت تخلیص PCR شرکت فرمنتاس (Fermentase)، جهت تعیین ترادف ژنی به شرکت فزاپژوه جهت ارسال به آزمایشگاه ماکروژن (Macrogen) در کشور کره جنوبی، ارسال گردید.

آزمایشات زیست تبدیلی اسید فرولیک تحت شرایط سلولهای در حال استراحت سویه نمک دوست نسبی

Archive of SID

www.SID.ir

HSL5 : به منظور تهیه سلولهای در حال استراحت سویه نمک دوست نسبیHSL5 ؛ سلولها ابتدا در محیط LB مایع نمکی حاوی ۸۰ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی رشد داده شدند. سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچالی (3000×g ، ۲۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد) برداشت و پس از شستشو در بافر فسفات نمکی (disodium/potassium phosphate (100 (mM), NaCl 80 g/l, pH 7)، مطالعات زیست تبدیلی با استفاده از سلولهای برداشت شده و در حضور ۱ گرم در لیتر در محیط بافری مذکور در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور شیکر 200 rpm انجام گرفت (۵). نمونه ها در فواصل زمانی مختلف مورد آنالیز کمی HPLC قرار گرفتند.

سنجش وانیلین و دیگر متوکسی فنلها با استفاده از HPLC : به منظور بررسی کمی میزان اسید وانیلیک و دیگرمتوکسی فنلهای تولید شده در مخلوط واکنشهای زیست تبدیلی، از روش HPLC استفاده شد. در دستگاه HPLC (مدل Jasco Pu-980، آمریکا) از ستون Hypersil ODs C18 [اندازه قطر ذرات فاز ثابت 5 µm]، به طول 25cm و قطر داخلی 4.6 mm و از محافظ ستون C18 به طول 1cm و قطر داخلی 4.6 mm استفاده شد. فاز متحرک متشکل از متانول: آب (به ترتیب به نسبت های ۳۵ به ۶۵ حجمی/حجمی) حاوی ۱ درصد تری فلورواستیک اسید. حجم تزریق شده ۲۰ µl، طول موج آشکارساز ۲۷۰ nm و میزان جریان ml/min ۱. استانداردهای مختلف اسید فرولیک، وانیلین، اسید وانیلیک و وانیلیل الکل در متانول تهیه شده و هرکدام سه بار به دستگاه HPLC تزریق شدند. با استفاده از منحنیهای کالیبراسیون به دست آمده غلظت هریک از ترکیبات مذکور در مخلوط واکنشهای زیست تبدیلی تخمین زده شد.

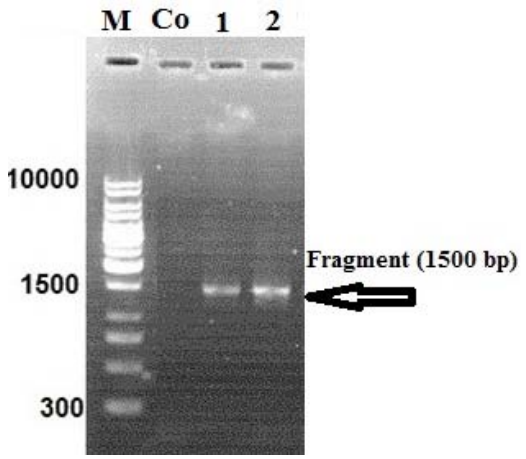
نتایج

جداسازی سویه های نمک دوست نسبی با قابلیت تبدیل کنندگی اسید فرولیک به اسید وانیلیک : جداسازی و شناسایی سویه های بومی با قابلیت تولید بیولوژیک متوکسی فنلهای با ارزش مانند اسید وانیلیک از پیش سازهای ازان قیمت مانند اسید فرولیک، گام نخست در انتخاب سویه های برتر برای تولید میکروبی اسید وانیلیک از اسید فرولیک است. در این راستا در یکسری آزمایشات غربالگری ۲۲ سویه باکتری نمک دوست نسبی از مناطق مختلف ایران (خاکهای شور و پرشور، آبهای شور و پرشور) براساس تکنیک غنی سازی جدا شدند. نمونه ها عمدتاً از خاکهای پرشور قم، خاک شور قشم، دریاچه حوض سلطان قم، دریاچه خزر و دریاچه بختگان فارس جمع آوری شده بودند. قابلیت زیست تبدیلی اسید فرولیک به اسید وانیلیک در تمام این سویه ها با استفاده از آنالیز کیفیHPLC (بر اساس ارتفاع پیک) مورد بررسی قرار گرفت. در بین سویه های غربالگری شده، سویه HSL5 (جدا شده از آب دریاچه قم) بالاترین میزان تولید اسید وانیلیک را نشان داد. سویه مذکور به عنوان سویه برتر جهت انجام مطالعات فنوتیپی و مولکولی برگزیده شد.

شناسایی سویه باکتری نمک دوست نسبی HSL5 : سویه HSL5 که براساس آنالیز HPLC دارای بیشترین تولید اسید وانیلیک از اسید فرولیک بود انتخاب و براساس ویژگیهای مورفولوژی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مورد شناسایی قرار گرفت (جدول ۱). براساس روشهای تشخیصی متداول شناسایی باکتریهای نمک دوست (۲۷) و همچنین مقایسه ویژگیهای سویه HSL5 با سایر باکتریهای نمک دوست شناخته شده (۳و۹)، سویه مذکور به طور موقت به عنوان *Halomonas salina* تشخیص داده شد. در ادامه جهت شناسایی و تعیین هویت دقیق سویه HSL5، اقدام به استخراج DNA ژنومی و تکثیر ژن 16S rDNA با استفاده از پرایمرهای یونیورسال 8F و 1541Rشد. همان گونه که در شکل (۱) مشاهده می شود، محصول PCR در

www.SID.ir

ناحیه 1.5 کیلو بازی نمایان شده است که حکایت از خلوص DNA مورد استفاده جهت تعیین توالی دارد. پس از مشخص شدن توالی ژن 16S rDNA سویه مذکور و بلاست نمودن آن در سایت اینترنتی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)، باکتری مورد نظر تعیین هویت شد. براساس نتایج حاصل از بلاست این سویه دارای مشابهت ۹۹ درصدی با گونه *H. salina* می باشد. در ادامه با ترسیم درختچه فیلوژنی بر پایه روش neighbor-joinig با استفاده از نرم افزار Mega-4 (http://www.megasoftware.net/) (۲۸) مشخص شد که این سویه در میان گونه های ثبت شده نزدیکترین قرابت ژنتیکی را با گونه های *H. salina* و *H. halophila* دارد. درختچه فیلوژنی سویه باکتری HSL5 در شکل (۲) نشان داده شده است.



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR سویه HSL5 . M (مارکر وزن مولکولی 1Kbp) ، Co (کنترل منفی)، 1 و 2 (سویه HSL5).

با توجه به متفاوت بودن برخی ویژگیهای متابولیسمی و فیزیولوژیکی (نظیر تست حرکت، رشد در نمک، رشد در دماهای مختلف و تخمیر قندها) سویه HSL5 با گونه *H. halophila*، سویه مذکور تحت عنوان *Halomonas salina* شناسایی و تعیین هویت گردید.

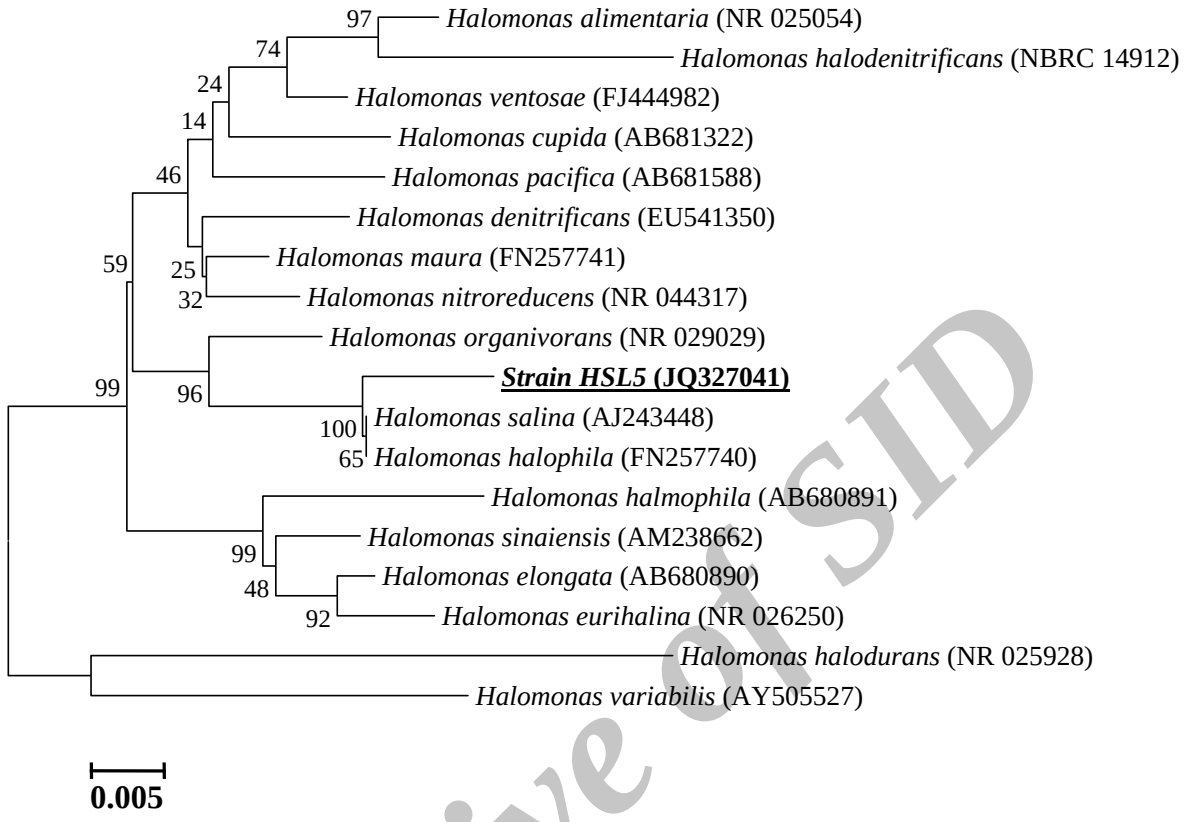
زیست تبدیلی اسید فرولیک به اسید وانیلیک و سایر متوکسی فنلهای با ارزش به وسیله سلولهای در حال استراحت *Halomonas salina* strain HSL5 : در این پژوهش از سلولهای در حال استراحت *Halomonas salina* strain HSL5 برای مطالعات زیست تبدیلی سویسترای اسید فرولیک استفاده شد.

جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک سویه HSL5

ویژگی	سویهHSL5
شکل ظاهری	کوکوباسیل گرم منفی
تولید رنگدانه	کرم متمایل به زرد
تست حرکت	منفی
تست اکسیداز	مثبت
تست کاتالاز	مثبت
رشد در شرایط بی هوازی	منفی
تولید اسید از قند گلوکز	منفی
تولید اسید از قند فروکتوز	منفی
تولید اسید از قند سوکروز	منفی
تست احیای نیترات	مثبت
تولید H2S	مثبت
هیدرولیز کازئین	منفی
هیدرولیز نشاسته	منفی
هیدرولیز توین ۲۰	منفی
هیدرولیز توین ۸۰	منفی
هیدرولیز اوره	مثبت
هیدرولیز ژلاتین	منفی
محدوده رشد در دما (^oC)	۳۷ تا ۴۲
محدوده رشد در pH	۵ تا ۱۰
محدوده رشد در نمک NaCl (درصد وزنی/حجمی)	۲,۵ تا ۲۰
بهینه رشد در نمک (درصد وزنی/حجمی)	۵ تا ۷,۵

Archive of SID

www.SID.ir



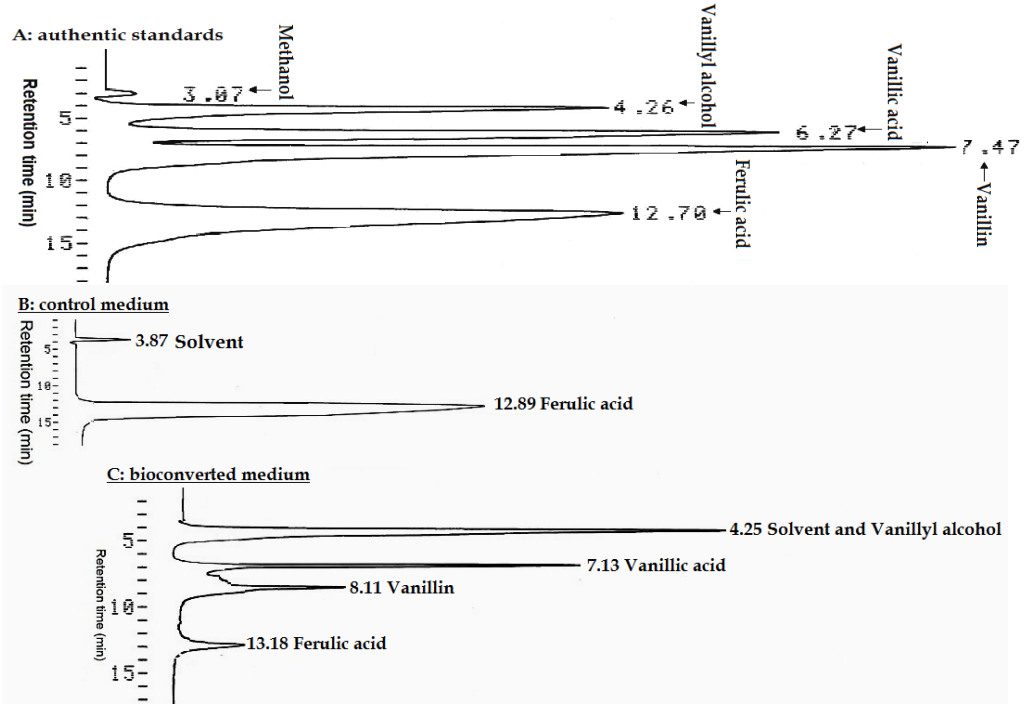
شکل ۲- درختچه فیلوژنی سویه مخمری HSL5 با استفاده از روش neighbor-joing

برای این منظور ابتدا سلولها در محیط LB نمکی حاوی ۸۰ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم برای مدت زمان ۳۰ ساعت رشد داده شدند (OD_{600nm}=4.5). پس از برداشت سلولها و تلقیح آنها به محیط بافری فسفات حاوی ۱ گرم در لیتر اسید فرولیک، نمونه ها در فواصل زمانی مختلف برداشت و مورد آنالیز HPLC قرار گرفت (رجوع شود به بخش مواد و روشها). در شکل (۳) کروماتوگرامهای HPLC حاصل از تشکیل متابولیت های اسید وانیلیک، وانیلین و وانیلیل الکل در طی فرآیند زیست تبدیلی اسید فرولیک تحت سلولهای در حال استراحت سویه HSL5 نشان داده شده است.

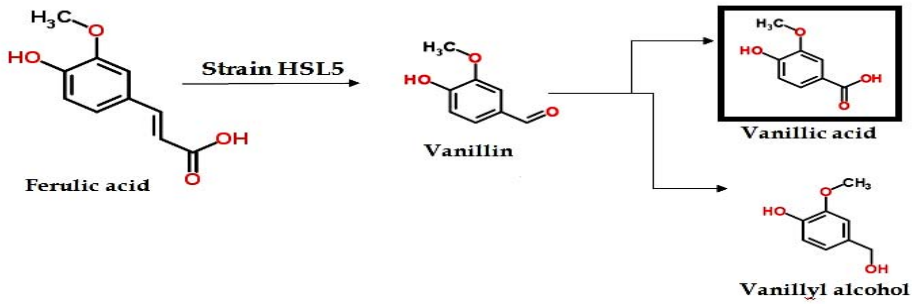
همانگونه که در شکل (۳) دیده می شود، وانیلیل الکل(Rt=4.25 min)، اسید وانیلیک (Rt=7.13 min) و وانیلین (Rt=8.11 min) به عنوان متابولیت های حاصل از بیوکانورژن اسید فرولیک تشخیص داده شده است. این متابولیت های تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی، در کشتهای کنترل [حاوی اسید فرولیک اسید (Rt=12.89) و بدون تلقیح باکتری]، انکوبه شده تحت شرایط مشابه، مشاهده نشدند. بنابر مشاهدات حاصل از آنالیز HPLC، مسیر متابولیکی احتمالی اسید فرولیک در سویه باکتری نمک دوست نسبی HSL5 در شکل (۴) ترسیم شده است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- کروماتوگرام های حاصل از HPLC پس از ۱۸ ساعت واکنش زیست تبدیلی سوبسترای اسید فرولیک به وسیله سلولهای در حال استراحت *Halomonas salina* strain HSL5. (A): کروماتوگرام حاصل از تزریق مخلوط چهار ترکیب متوکسی فنلی استاندارد به وسیله دستگاه HPLC، (B) محیط کنترل و (C) محیط واکنش زیست تبدیلی.

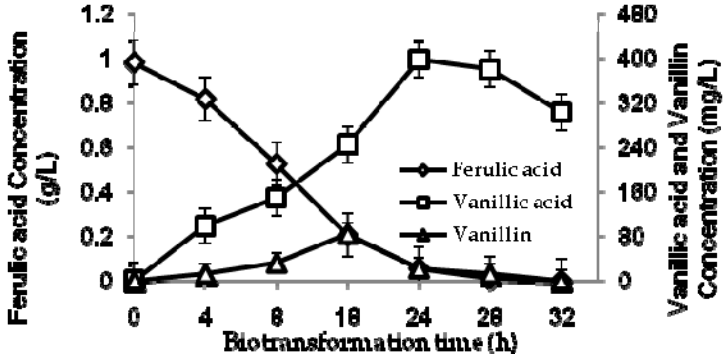


شکل ۴- مسیر متابولیکی پیشنهادی در ارتباط با واکنش زیست تبدیلی اسید فرولیک به وسیله سویه نمک دوست نسبی HSL5

برای ارزیابی کمی روند واکنش زیست تبدیلی اسید فرولیک، آزمایشی با استفاده از ۵۰ میلی لیتر از سلولهای در حال استراحت سویه HSL5، تعلیق شده در محیط بافری فسفات حاوی 1 گرم در لیتر سوبسترای اسید فرولیک، در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری، تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm، انجام پذیرفت (شکل 5). همان گونه که در شکل (۵) مشاهده می شود پس از گذشت 32 ساعت از شروع فرآیند بیوکانورژن سوبسترای فرولیک اسید به طور کامل از مخلوط بیوکانورژن حذف شده که نمایانگر شکسته شدن حلقه آروماتیک به وسیله

www.SID.ir

سویه HSL5 می باشد. سلولهای در حال استراحت این سویه پتانسیل تبدیل ۱ گرم از سوبسترای اسید فرولیک اسید را به 397 میلی گرم در لیتر اسید وانیلیک (راندمان مولی ۴۶/۸ درصد) و ۸۴ میلی گرم در لیتر وانیلین (راندمان مولی ۱۰/۹ درصد) پس از گذشت به ترتیب ۲۴ و ۱۸ساعت از شروع واکنش بیوکانورژن دارا می باشند.



شکل ۵- زیست تبدیلی اسید فرولیک به وسیله سلولهای در حال استراحت *Halomonas salina* HSL5. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش و بار۱± معرف انحراف معیار است.

بحث و نتیجه گیری

علی رغم قیمت بالای ترکیبات آروماتیک طبیعی با منشاء گیاهی این ترکیبات دارای مشتریان بسیار زیادی در سرتاسر جهان به ویژه در اروپا و آمریکا می باشند. از دلایل بالا بودن قیمت تمام شده ترکیبات معطر طبیعی با منشاء گیاهی می توان تغییرات شرایط آب و هوایی، رشد کند گیاه، پیچیدگی شرایط کشت، سختی مراحل استخراج و همچنین راندمان پایین را نام برد. با توجه به معضلات و مشکلات مربوط به تولید فرآورده های معطر طبیعی با منشاء گیاهی، محدود بودن منابع آن و همچنین افزایش رو به رشد تقاضای جهانی، لزوم جستجوی منابع جایگزین برای تولید ترکیبات معطر طبیعی الزامی می باشد (۲۳). درحال حاضر مهم ترین فرآیند بیوتکنولوژیک برای تهیه وانیلین طبیعی و سایر متوکسی فنلهای با ارزش (به ویژه اسید وانیلیک) فرآیند زیست تبدیلی میکروبی است. فرآیند زیست تبدیلی میکروبی اولاً فرآیندی همسو و متناسب با محیط زیست بوده (شیمی سبز) و ثانیاً ترکیبات معطر تولیدی به وسیله فرآیند بیوترانسفورماسیون میکروبی جزء ترکیبات طبیعی طبقه بندی می شوند و بنابراین در بازارهای جهانی با استقبال بالایی از سوی مصرف کنندگان مواجه می شوند (۳۳). به طور کلی تولید ترکیبات معطر طبیعی با استفاده از فرآیندهای بیوتکنولوژیک می تواند امکان تولید بیشتر محصول، تولید طعمهای طبیعی، اطمینان از کیفیت ثابت و مطلوب محصول، آسانی مراحل خالص سازی و تولید ترکیبات ویژه ای که با روشهای مصنوعی امکان پذیر نمی باشد را فراهم نماید. اسید فرولیک از مشتقات اسید سینامیک بوده که در انواع پسمانده های کشاورزی شامل پسمانده نیشکر، چغندرقند، سبوس گندم و برنج و همچنین تفاله کوبیده ذرت به وفور یافت می شود. از آنجایی که وانیلین و اسید وانیلیک به عنوان دو حدواسط اصلی در مسیر تجزیه ای اسید فرولیک تشکیل می شوند، تحقیقات وسیعی در این زمینه صورت گرفته است. وانیلین و اسید وانیلیک از مهم ترین ترکیبات معطرآروماتیک استفاده شده در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی،آرایشی و بهداشتی، پزشکی و دارویی می

www.SID.ir

باشند (۲۳). میکرواورگانیسم های نمک دوست از نظر فیلوژنیکی گروه متنوعی از باکتریها هستند که از لحاظ سازگاری با درصدهای پایین نمکها می باشند، اما این توانایی را دارند که تغییرات سریع در جهت تطبیق با غلظتهای بالای نمک داشته باشند (۳۲). با توجه به اینکه قدم اول در شناسایی توان میکرواورگانیسم های با قابلیت زیست تبدیلی اسید فرولیک به اسید وانیلیک، شناسایی میکرواورگانیسم های دارای تحمل پذیری بالا نسبت به این سوبسترای سمی می باشد (۳۴) و از آنجا که میکرواورگانیسم های نمک دوست به طور طبیعی به غلظتهای بالای آنیونی و کاتیونی برای رشد نیاز دارند و دارای تحمل پذیری بالا نسبت به فلزات سمی، اکسی آنیونهای سمی و همچنین قابلیت آنزیمی بالایی دارند بنابراین می توانند گزینه مناسبی برای مطالعات زیست تبدیلی میکروبی باشند. از مزایای دیگر استفاده از این میکرواورگانیسم ها می توان به نیازمندیهای رشدی ساده آنها اشاره نمود. هدف از مطالعه اخیر جداسازی و شناسایی باکتریهای نمک دوست با پتانسیل تبدیل کنندگی اسید فرولیک به اسید وانیلیک و بررسی امکان استفاده از این باکتریها به عنوان زیست واکنشگر برای تهیه متابولیت های با ارزش به ویژه وانیلین و اسید وانیلیک بود. در این راستا، غربالگری سویه های نمک دوست از نمونه های خاک و آب مناطق شور و یا پرشور منجر به جداسازی ۲۲ سویه نمک دوست نسبی شد. سویه های جدا شده از نظر قابلیت زیست تبدیلی اسید فرولیک به اسید وانیلیک مورد آنالیز HPLC قرار گرفتند. براساس یافته های حاصل از HPLC، سویه HSL5 (جدا شده از آب دریاچه قم) دارای بیشترین تولید اسید وانیلیک بود. سویه مذکور به عنوان سویه برتر انتخاب گردید و مورد شناسایی فنوتیپی و مولکولی قرار گرفت. نتایج آنالیزهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیلوژنیکی نشان داد که سویه مذکور دارای بیشترین مشابهت با *Halomonas salina* می باشد. توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rDNA سویه HSL5 با شماره دسترسی JQ327041 در بانک اطلاعات ژنی NCBI قابل دسترس می باشد. در ادامه این تحقیق با هدف افزایش راندمان واکنش زیست تبدیلی و جلوگیری از تجزیه بیشتر اسید وانیلیک از استراتژی سلولهای در حال استراحت استفاده شد. محققان زیادی از این استراتژی برای بهبود فرآیندهای زیست تبدیلی استفاده نموده اند. در سال ۱۹۹۸، Barghini و همکارانش (۶) از استراتژی فوق جهت بهبود زیست تبدیلی اسید فرولیک به اسید وانیلیک در *Pseudomonas fluorescence* BF13 استفاده نمودند. Abdelkafi و همکارانش (۲) از استراتژی سلولهای در حال استراحت به طور موفقیت آمیزی جهت بهبود زیست تبدیلی اسید فرولیک به اسید وانیلیک در *Halomonas elongata* DSM 2581T استفاده نموده اند. Ashengroph و همکارانش (۴) از استراتژی فوق به صورت موفقیت آمیزی جهت بهبود زیست تبدیلی ایزواوژنول به وانیلین و اسید وانیلیک در سویه مخمری *Candida galli* PGO6 استفاده کردند. از مزایای استفاده از استراتژی سلولهای در حال استراحت می توان به جلوگیری از تکثیر بیومس سلولی، انجام فرآیند زیست تبدیلی تحت شرایط غیر استریل و جداسازی آسان تر محصول تولیدی اشاره نمود. با توجه به مزایای استفاده از سلولهای در حال استراحت، مطالعات زیست تبدیلی اسید فرولیک تحت سلولهای در حال استراحت *H. salina* strain HSL5 بررسی شد. براساس نتایج به دست آمده سلولهای در حال استراحت سویه HSL5 توانایی زیست تبدیلی ۱ گرم اسید فرولیک را به ۸۴ میلی گرم در لیتر وانیلین (با راندمان مولی ۱۰/۹ درصد) و ۳۹۷ میلی گرم در لیتر اسید وانیلیک (با راندمان مولی ۴۶/۸ درصد) پس از گذشت به ترتیب ۱۸ و ۲۴ ساعت از آغاز واکنش زیست تبدیلی دارا می باشد. اگرچه در ارتباط با تولید متابولیت با ارزش اسید وانیلیک از اسید فرولیک، مطالعات وسیعی در انواع مختلفی از میکرواورگانیسم ها صورت گرفته است (رجوع شود به بخش مقدمه) اما با این حال به جز چند

www.SID.ir
Archive of SID

مطالعه که در زیر به آنها اشاره گردیده است در بیشتر مطالعات راندمان تولید اسید وانیلیک از اسید فرولیک بسیار پایین گزارش شده است. در مطالعه صورت گرفته توسط Brunati و همکارانش در سال ۲۰۰۴ (۱۰)، با استفاده از *Streptomyces halstedii* سوبسترای اسید فرولیک (غلظت ۱ گرم در لیتر) پس از ۲۴ ساعت واکنش زیست تبدیلی به اسید وانیلیک با راندمان مولی ۸۰ درصد، تحت شرایط بهینه شده، تبدیل شده است. در دیگر مطالعه صورت گرفته توسط Abdelkafi و همکارانش در سال ۲۰۰۸ (۲) با استفاده از باکتری نمک دوست *Halomonas elongata*، اسید فرولیک (غلظت ۱۰ میلی مولار) پس از ۱۰ ساعت واکنش زیست تبدیلی به اسید وانیلیک با راندمان مولی ۸۲ درصد، تحت شرایط بهینه شده، تبدیل شده است. براساس یافته های حاصل از این پژوهش و مقایسه آن با سایر تحقیقات صورت گرفته، دستاوردهای حاصل از این تحقیق را می توان به صورت زیر خلاصه نمود. باکتریهای نمک دوست با توجه به داشتن ویژگیهایی مانند سریع الرشد بودن، نیاز غذایی کم و توانایی استفاده از انواع ماکرومولکولها به عنوان تنها منبع دریافت انرژی و همچنین عدم ایجاد آلودگی برای استفاده در فرآیندهای صنعتی مناسب هستند (۱۷). علی رغم قابلیت بالای باکتریهای نمک دوست در تولید انواع آنزیمهای هیدرولیتیک که باعث ارزشمندی این میکرواورگانیسم ها در فرآیندهای مختلفی از جمله پاکسازی زیستی و واکنشهای زیست تبدیلی شده است، با این وجود تنها مطالعه صورت گرفته بر روی میکرواورگانیسم های نمک دوست در ارتباط با تولید وانیلین از سوبسترای اسید فرولیک توسط Abdelkafi و همکارانش در سال ۲۰۰۶ (۱) صورت گرفته است. این محققان به وسیله سلولهای در حال استراحت سویه نمک دوست نسبی غربالگری شده *Halomonas elongata* starin Mar موفق به تولید ۳,۴ میلی مولار اسید وانیلیک از ۵ میلی مولار سوبسترای اسید فرولیک با راندمان مولی ۸۶ درصد شدند. با این حال، در تحقیق اخیر تجمعی از متابولیت ارزشمند وانیلین در مخلوط واکنش زیست تبدیلی مشاهده نشده است. مطالعه اخیر نخستین گزارش از تولید مؤثر متابولیت های وانیلین و اسید وانیلیک از سوبسترای اسید فرولیک در گونه *H. salina* می باشد. با مقایسه راندمان اسید وانیلیک به دست آمده به وسیله سویه بومی غربالگری شده در این مطالعه (۴۶/۸ درصد) با سایر مطالعات صورت گرفته می توان امیدوار بود که سویه HSL5 سویه مناسبی جهت انجام مطالعات زیست تبدیلی اسید فرولیک به اسید وانیلیک باشد چرا که راندمان به دست آمده تحت شرایط بهینه نشده بوده و پس از به کارگیری تکنیک های بهینه سازی شامل بهینه سازی ترکیبات محیط کشت و ساخت سویه های موتانت می توان امیدوار بود که به راندمانهای مولی بالاتری از اسید وانیلیک و وانیلین دست پیدا کرد.

منابع

1. Abdelkafi, S. Sayadi, S. Gam, Z.B.A. Casalot, L and Labat, M. (2006). Bioconversion of ferulic acid to vanillic acid by *Halomonas elongata* isolated from table-olive fermentation. *FEMS Microbiology Letters*. 262: 115–120.
2. Abdelkafi, S. Labat, M. Gam, Z.B.A. Lorquin, J. Casalot, L and Sayadi, S. (2008). Optimized conditions for the synthesis of vanillic acid under hypersaline conditions by *Halomonas elongate* DSM 2581T resting cells. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 24: 675–680.
3. Arahal, D.R. Ludwig, W. Schleifer, K.H and Ventosa, A. (2002). Phylogeny of the family Halomonadaceae based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 241–249.
4. Ashengroph, M. Nahvi, I. Zarkesh-Esfahani, H and Momenbeik, F. (2011). *Candida galli* Strain PGO6: A Novel Isolated Yeast Strain Capable of Transformation of Isoeugenol into Vanillin and Vanillic Acid. *Current Microbiology*. 62: 990–998.

Archive of SID

www.SID.ir

5. Ashengroph, M. Nahvi, I. Zarkesh- Esfahani, H and Momenbeik, F. (2012). Conversion of Isoeugenol to Vanillin by *Psychrobacter* sp. Strain CSW4. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166: 1-12.

6. Barghini, P. Montebove, F. Ruzzi, M and Schiesser, A. (1998). Optimal conditions for bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by *Pseudomonas fluorescens* BF13 cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49: 309–314.

7. Baron, E.J and Finegold, S.M. (1990). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 8th edn. St Louis: Mosby.

8. Bock, L.H and Anderson, J.K. (1955). Linear polyesters derived from vanillic acid. *Journal of Polymer Science*. 17: 553-558.

9. Bouchotroch, S. Quesada, E. Moral, A. Llamas, I and Bejar, V. (2001). *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 1625–1632.

10. Brunati, M. Marinelli, F. Bertolini, C and Gandolfi, R. (2004). Biotransformation of cinnamic acid and ferulic acid with actinomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*. 34: 3-9.

11. Fadl, A.A. Nguyen, A.V and Khan, M.I. (1995). Analysis of *Salmonella enteritidis* isolates by arbitrarily primed PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 987-989.

12. Fitzgerald, D.J. Stratfordb, M and Narbada, A. (2003). Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International Journal of Food Microbiology*. 86: 113–122.

13. Ghosh, S. Sachan, A. Sen, S.K and Mitra, A. (2007). Microbial transformation of ferulic acid to vanillic acid by *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34: 131–138.

14. Karmakar, B. Vohra, R.M. Nandanwar, H. Sharma, P. Gupta, K.G and Sobti, R.C. (2000). Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *Journal of Biotechnology*. 80: 195–202.

15.Krishnamohan and Khanna, S. (1994). Metabolism of ferulic acid by *Alcaligenes paradoxus*. *Indian Journal of Microbiology*. 34: 303-306.

16. Liese, A. Seelbach, K and Wandrey, C. (2006). Industrial Biotransformation. 2nd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

17. Margesin, R and Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5: 73–83.

18. Müller, B. Münch, T. Mulheim, A and Welti, M. (1998). Process for the production of vanillin. European Patent EP0885968.

19. Nieto, J.J. Fernandez-Castillo, R. Marquez, M.C. Ventosa, A. Quesada, E and Ruiz-Berraquero, F. (1989). Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 2385–2390.

20. Oddou, J. Stentelaire, C. Lesage-Meessen, L. Asther, M and Ceccaldi, B.C. (1999). Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53: 1–6.

21. Otuk, G. (1985). Degradation of ferulic acid by *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation Technology*. 63: 501-6.

22. Pometto, A.L and Crawford, D.L. (1983). Whole-cell bioconversion of vanillin to vanillic acid by *Streptomyces viridosporus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 1582–1585.

23. Priefert, H. Babenhorst, J and Steinbuchel, A. (2001). Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 296–314.

24. Rabenhorst, J and Hopp, R. (1997). Process for the preparation of vanillin and suitable microorganisms. European Patent EP0761817.

25. Rosazza, J.O.N. Huang, Z. Dostal, L and Rosseau, B. (1995). Biocatalytic transformation of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 15: 457-471.

26. Shimoni, E. Ravid, U and Shoham, Y. (2000). Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *Journal of Biotechnology*. 78: 1–9.

27.Simbert, R.M and Krieg, N.R. (1994). Phenotypic characterization. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (eds) Methods for general and molecular bacteriology. Washington, DC, pp. 607–654.

28. Tamura, K. Dudley, J. Nei, M and Kumar, S. (2007). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.

Archive of SID
www.SID.ir

Molecular Biology and Evolution. 24(8): 1596-1599.

29. Toms, A and Wood, J. (1970). The degradation of trans-ferulic acid by *Pseudomonas cidovarans*. *Biochemistry*. 9: 337-343.

30. Tsujiyama, S.I and Ueno, M. (2008). Formation of 4-Vinyl Guaiacol as an Intermediate in Bioconversion of Ferulic Acid by *Schizophyllum commune*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 72 (1): 212-215.

31. Usha, T. Ramachandra, R.S and Ravishankar, G.A. (1999). A process for the preparation of vanilla flavour metabolites through biotransformation. Indian Patent (pending) NF269/99.

32. Ventosa, A. Nieto, J. J and Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 62: 504-544.

33. Xu, P. Hua, D and Ma, C. (2007). Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavor production. *Trends Biotechnology*. 25: 571-576.

34. Zhang, M. Xu, P. Han, S. Yan, H and Ma, C. (2006). Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73: 771–779.

Use of Resting Cells of *Halomonas salina* HSL5 as Biocatalyst for Biological Vanillic acid Production

Ashengroph M.[1] and Nahvi I.[2]

[1] Biology and Biotechnology Dept., Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran

[2] Microbiology Dept., School of Biology, University College of Science, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Archive of SID

Abstract

The rising popularity of natural aroma products such as vanillin and vanillic acid has triggered off significant research activities to use biocatalysts for the production of natural flavor compounds. We conducted this study to screen moderately halophilc bacteria which are able to degrade ferulic acid and to study the possibility of forming vanillic acid via conversion of ferulic acid under resting cells conditions. 22 different strains of bacteria were isolated from different samples collected from the salty environments of Iran. Primary screening was performed by HPLC analyse. The selected strains were identified based on physiochemical characteristics as well as molecular phylogenetic analysis. Biotransformation mixtures were quantified for vanillic acid content and the other produced methoxyphenols by HPLC analyse. Based on the HPLC results obtained, among the 22 isolated strains, resting cells of *Halomonas salina* HSL5 (GenBank accession number **JQ327041)** produce the greatest quantity of vanillic acid (397 mg/l, molar yield of 46.8%) after a 24-h reaction time, without further optimization The current study brings the first report for bioconversion of ferulic acid to vanilic acid in the *Halomonas salina*.

Key words: Microbial bioconversion, Ferulic acid, Vanillic acid, *Halomonas salina* HSL5.

www.SID.ir