بهینه‌سازی تولید بیووانیلین از سلول‌های در حال استراحت سویه بومی *Psychrobacter* sp. CSW4 به روش آماری تاگوچی

مراحم آشنگرف[۱]
ایرج نحوی[۲]، جهانشیر امینی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۵
تاریخ تصویب: ۹۱/۱۰/۱۲

چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از فرایندهای زیست تبدیلی میکروبی برای دستیابی به وانیلین با خواص ویژه و با منشأ طبیعی مورد توجه قرار گرفته است. هدف از پژوهش اخیر، بهینه‌سازی فرآیند زیست تبدیلی ایزواوژنول به وانیلین تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت سویه‌ی بومی Psychrobacter sp. CSW4 با استفاده از روش آماری تاگوچی بود. متغیرهایی که در فرایند زیست تبدیلی ایزواوژنول به وانیلین در نظر گرفته شده‌اند، عبارت‌اند از: غلظت اولیه‌ی ایزواوژنول، غلظت اولیه‌ی بیومس سلولی، سوبسترای‌های کمکی (گلیسرول، عصاره مخمر و تریپتون)، غلظت اولیه‌ی نمک سدیم کلراید و یون‌های فلزی (مس، روی و کبالت). برای موارد متغیر مذکور، آرایه‌ی متعامد مناسب L18 طراحی شد. وانیلین تهیه‌شده از ایزواوژنول در مخلوط واکنش زیست تبدیلی با استفاده از روش HPLC تخمین زده شد. بهینه‌سازی فرایند زیست تبدیلی به وسیله‌ی روش تاگوچی نشان داد که عوامل با تأثیر معناداری بر بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین با میزان اهمیت (به ترتیب) غلظت اولیه‌ی نمک سدیم کلراید، غلظت اولیه‌ی ایزواوژنول، سوبسترای کمکی گلیسرول، یون فلزی کبالت و غلظت اولیه بیومس سلولی بودند. تحت شرایط بهینه در سطوح انتخاب‌شده‌ی این فاکتورها، ماکزیمم غلظت وانیلین ۱/۰۱۶ گرم در لیتر (با راندمان مولی ۴۳/۸ درصد) پس از ۲۴ ساعت واکنش زیست تبدیلی تخمین زده شد. براساس یافته‌های حاصل از این پژوهش، چنانچه بهینه‌سازی ترکیبات

۱. استادیار گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه کردستان m.ashengroph@uok.ac.ir
۲. استاد گروه زیست‌شناسی دانشکده‌ی علوم دانشگاه اصفهان
۳. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه کردستان

محیط کشت برای بالانس نمودن رشد سلولی و میزان تولید وانیلین انجام گیرد، می‌توان به راندمان‌های پذیرفتنی بدون استفاده از مواد سمی غیرمجاز و یا اضافه نمودن موادی که مستلزم صرف هزینه‌های بالای اقتصادی هستند، دست یافت.

کلیدواژه‌ها: *ایزواوژنول، روش تاگوچی، زیست تبدیلی میکروبی، وانیلین، Psychrobacter sp. CSW4*

مقدمه

وانیلین در میان ترکیبات آروماتیک شناخته شده، بیشترین مصرف جهانی را به خود اختصاص داده است. در سال ۲۰۰۷ مصرف جهانی ترکیبات آروماتیک بیش از ۳۰۰۰۰ تن در سال بود که ارزشی معادل ۲۰ میلیارد دلار داشته است و روند افزایشی سالیانه‌ی آن بین ۱۱ تا ۱۲ درصد برآورد شده است. در این میان تقاضای جهانی برای مصرف وانیلین بیش از ۱۶۰۰۰ تن در سال بوده است (Xu et al, 2007). در حال حاضر از وانیلین به طور گسترده در صنایع غذایی، دارویی و پزشکی، آرایشی و بهداشتی استفاده می شود (Priefert et al, 2001). از مصارف عمده‌ی وانیلین در صنایع غذایی می‌توان به مواردی، از قبیل استفاده از وانیلین به عنوان طعم و مزه‌دهنده، اشاره نمود. در واقع، از وانیلین برای بهبود طعم و مزه انواع شکلات‌ها، نوشیدنی های الکلی و غیرالکلی، انواع نوشیدنی‌های گازدار و بدون گاز، انواع بستنی‌ها، انواع شیرینی‌ها، محصولات نانوایی و غیره استفاده می شود (Fitzgerald et al, 2003). از موارد دیگر مصرف وانیلین در صنایع غذایی می‌توان به استفاده از این ترکیب به عنوان نگهدارنده‌ی مواد غذایی اشاره نمود. تحقیقات نشان داده که این ترکیب در غلظت حدود ۲ گرم در لیتر باعث توقف رشد اکثر مخمرها و کپک‌های فاسدکننده‌ی مواد غذایی و همچنین ممانعت از رشد بیشتر باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌شود (Matamoros et al, 1999). از دیگر موارد مصرف وانیلین در صنایع غذایی می‌توان به استفاده از آن به عنوان یک آنتی اکسیدان بالقوه در بسیاری از مواد غذایی و دارویی، به ویژه در مواد غذایی کمپلکس حاوی اسیدهای چرب چند غیراشباعی اشاره نمود. در واقع، این ترکیب آلدئیدی با اکسیده شدن، مانع از اکسیداسیون مواد حساس در برابر اکسیداسیون می شود (Burriet al, 1989). اکنون عمده وانیلین مصرفی از طریق روش سنتز شیمیایی (بیش از ۹۰ درصد) تأمین می‌شود. در ارتباط با تولید وانیلین از طریق سنتز شیمیایی باید ذکر نمود که این فرایندها از نظر زیست محیطی بسیار زیانبار و پرهزینه است و به سبب دفع پسمانده‌های سمّی، و از همه مهم‌تر، ترکیبات سنتزشده از طریق روش‌های سنتز شیمیایی در گروه ترکیبات غیرطبیعی، طبقه‌بندی می‌شوند و همین این امر باعث شده است، ترکیبات اخیر با استقبال کمی از سوی مشتریان در بازارهای جهانی مواجه گردند (Priefert et al, 2001). این موضوع خود محرک تحقیقات بیشتر در زمینه‌ی توسعه‌ی فرایندهای بیوتکنولوژیک نوین برای تولید خوش‌طعم کننده‌های غذایی با ارزش، به ویژه

وانیلین، شده است. دو روش عمده‌ی دستیابی به وانیلین طبیعی، شامل استخراج مستقیم از منابع گیاهی و زیست تبدیلی میکروبی است. با توجه به کاربرد گسترده‌ی وانیلین، افزایش روزافزون تقاضا برای مصرف وانیلین طبیعی و همچنین پرهزینه‌بودن و زمان‌بری استخراج از منابع گیاهی، این گیاه به تنهایی قادر به تأمین بازارهای جهانی نیست، لزوم توسعه‌ی فرایندهای بیوترانسفورماسیون میکروبی به‌منزله‌ی جایگزین مناسب، الزامی است. (Krings and Berger, 1998). پروپنیل بنزن‌ها که در دو گروه پروپنیل بنزن‌ها و پروپنیل بنزن‌ها، براساس موقعیت باند دوگانه روی زنجیره‌ی جانبی تقسیم‌بندی شده‌اند، شامل انواع مختلفی از سوبستراهای فنلی، از جمله اوژنول، ایزواوژنول، فرولیک اسید و وانیلیک اسید هستند که به عنوان سوبستراهای طبیعی پیش‌ساز برای سنتز وانیلین طبیعی در واکنش‌های بیوترانسفورماسیون میکروبی به کار گرفته شده‌اند. از بین سوبستراهای فنیل پروپانوئیدی ذکرشده، ایزواوژنول به عنوان سوبسترای طبیعی تجدیدپذیر و ارزان‌قیمت از جذابیت بالاتری برای تولید وانیلین برخوردارند، بنابراین در سال‌های اخیر، بیشتر مطالعات بر استفاده از ایزواوژنول متمرکز شده است (Priefert et al, 2001). ایزواوژنول (۴-هیدروکسی-۳- متوکسی-۱- پروپنیل بنزن) با فرمول بسته‌ی $C_{10}H_{12}O_2$ یک ترکیب فنیل پروپانوئیدی است که می‌توان آن را هم از طریق استخراج مستقیم از برخی روغن‌های گیاهی، از جمله میخک، جوزهندی و دارچین و هم با استفاده از ایزومریزاسیون اوژنول به دست آورد (Seshadri et al, 2008). نخستین بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین در یک سویه‌ی قارچی *Aspergillus niger* ATCC9142 گزارش شده است. میزان وانیلین تولیدی حاصل از این فرآیند ۰.۰۸ گرم در لیتر و راندمان مولی حدود ۱۰ درصد بوده است (Abraham et al, 1988). اگرچه در طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های مختلف شامل *Serratia marcescence* (Rabenhorst and Hopp, 1991)، *Rhodococcus rhodochrous* (Chatterjee et al, 1999)، *Bacillus subtilis* B2 (Shimoni et al, 2000)، *Bacillus fusiformis* (Zhao et al, 2005)، *Pseudomonas chlororaphis* (Kasana et al, 2007)، *Pseudomonas putida* (Yamada et al, 2007)، *Candida galli* PGO6 (آشنگرف و همکاران ۲۰۱۱)، *Pseudomonas aeruginosa*، بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین گزارش شده است، اما با وجود این در بیشتر مطالعات صورت‌گرفته، وانیلین تولیدشده، به سبب اکسیدشدن به وانیلیک اسید و یا احیای آن به وانیلیل الکل توسط میکرواورگانیسم بسیار پایین، گزارش شده است (Overhage et al, 1999). روش تاگوچی یکی از روش‌های کارآمد در طراحی آزمایش است، به گونه‌ای که با این روش تعداد آزمایش‌ها کاهش یافته است و این عمل باعث کاهش هزینه و زمان آنها نیز می‌شود. همچنین با استفاده از این روش می‌توان اینترکشن‌های احتمالی بین فاکتورهای مختلف را مطالعه نمود (Rao et al, 2008). اگرچه گزارش‌های متعددی درباره‌ی با بهینه‌سازی فرایندهای بیوتکنولوژیک به وسیله‌ی

روش آماری تاگوچی وجود دارد (Han et al, 1998) ، (Mohapatra et al, 2009)، با این حال، مطالعه‌ی اخیر نخستین گزارش از کاربرد روش تاگوچی در بهینه‌سازی تولید وانیلین تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت است. از آنجا که تا به حال مطالعه‌ی دقیقی در ارتباط با بهینه‌سازی فرآیند بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به متابولیت با ارزش وانیلین تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت انجام نشده است، این پژوهش به منظور بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت با هدف دستیابی به غلظت بالاتری از وانیلین طبیعی تولیدی در مخلوط واکنش بیوترانسفورماسیون سویه‌ی باکتری بومی نمک‌دوست *Psychrobacter* sp. strain CSW4 انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و دستگاهها

ایزواوژنول (۹۸ درصد) و وانیلین (۹۹ درصد) از شرکت سیگما خریداری شد (St. Louis, Mo). استو نیتریل و اسید فرمیک با درجه‌ی خلوص بسیار بالا مخصوص دستگاه HPLC از شرکت مرک تهیه شد (E. Merck, Darmstadt, Germany). سایر مواد شیمیایی استفاده‌شده با درجه‌ی خلوص بالا (آنالیتیک) بودند. دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مجهز به آشکارساز جذب UV استفاده شد.

میکروارگانیسم و شرایط نگهداری

در این تحقیق، سویه‌ی باکتری تحمل‌کننده‌ی نمک *Psychrobacter* sp. CSW4 (جدا شده از آب دریاچه‌ی خزر) مقاوم به ایزواوژنول، با قابلیت بیوترانسفورماسیون سوبسترای ایزواوژنول به متابولیت‌های با ارزش وانیلین و وانیلیک اسید که در مطالعه‌ی قبلی آشنگرف و همکارانش (2011) غربالگری شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. به منظور نگهداری سویه CSW4 از دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد و محیط کشت نمکی جامد و اسلنت لوریا برتانی (LB) [Casein peptone: 10 g/l, Yeast extract: 5 g/l, NaCl: 80 g/l, Agar Agar 20 g/l , pH 7] استفاده شد.

اندازه‌گیری وزن خشک

یک میلی لیتر از مخلوط واکنش بیوترانسفورماسیون را که سویه باکتری CSW4 به آن تلقیح شده است، در زمان‌های مشخص برداشت، و با دور *12000 g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سوپرناتانت دور ریخته و با آب مقطر به حجم یک میکرولیتر رسانده شد، سپس ورتکس سریع و مجدداً به روش بالا سانتریفوژ شد. سوپرناتانت دور ریخته شد و در آون با درجه‌ی حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید.

تهیه‌ی سلول‌های در حال استراحت سویه CSW4

برای تهیه‌ی سلول‌های در حال استراحت، ابتدا سویه‌ی CSW4، در محیط لوریا برتانی نمکی تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی رشد داده شده

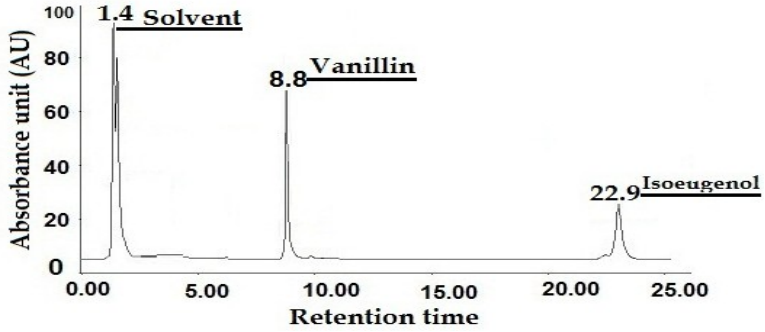
است. سپس سلول‌ها با استفاده از سانتریفیوژ یخچالی (3000×g، ۲۰ دقیقه و ۴ درجه سانتی گراد) برداشت و بیومس سلولی سه مرتبه در محیط بافری فسفات (disodium/potassium phosphate 100 mM) شست‌وشو داده شد. از این سلول‌ها به عنوان سلول‌های در حال استراحت برداشت‌شده از انتهای فاز رشد لگاریتمی، به عنوان زیست واکنشگر برای مطالعات بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول استفاده شد. تمامی آزمایش‌های بیوترانسفورماسیون در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط بافری فسفات و تحت شرایط دمایی ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد و دور شیکر 200 rpm بعد از ۲۴ ساعت گذاشتن در گرمخانه انجام گرفت.

سنجش وانیلین تولیدی در مخلوط واکنش بیوترانسفورماسیون با استفاده از HPLC

سنجش وانیلین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، مجهز به آشکارساز جذب UV انجام شد. در دستگاه HPLC از ستون C18 (اندازه‌ی قطر ذرات فاز ثابت ۵ میکرون)، به طول ۱۵ سانتیمتر و قطر داخلی ۶/۴ میلیمتر استفاده شد. فاز متحرک متشکل از دو حلال، حلال A (استو نیتریل ۱۰ درصد ساخته شده در محلول آبی فرمیک اسید 0.1 درصد) و حلال B (استو نیتریل ۳۵ درصد ساخته شده در محلول آبی فرمیک اسید 0.1 درصد) بود. آنالیز نمونه‌ها تحت شرایط خطی (گرادیانت) زیر انجام گرفت: ۰ تا ۴ دقیقه ۱۰۰ درصد محلول A، ۴ تا ۲۰ دقیقه ۱۰۰ درصد محلول B و به دنبال اتمام هر گرادیانت و قبل از تزریق نمونه‌ی بعدی برای رسیدن به زمان تعادل اولیه ۱۰ دقیقه به زمان گرادیانت اضافه شد. میزان جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه، طول موج آشکارساز ۲۷۰ نانومتر، حجم تزریق شده ۲۰ میکرولیتر. همه مراحل آزمایش در دمای اتاق انجام شد. تحت شرایط کروماتوگرافی ذکر شده، زمان‌های بازداری برای وانیلین و ایزواوژنول به ترتیب در زمان های 8.8 و 22.9 دقیقه، به دست آمد (شکل ۱).

طراحی آزمایش به روش تاگوچی

طراحی آزمایش در این پژوهش طبق روش آماری تاگوچی صورت گرفت. پیش از طراحی، متغیرهای مؤثر شناسایی شد و سطوح مورد نظر آنها تعیین شدند. متغیرهایی که در فرایند بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین توسط سویه نمک دوست CSW4 در نظر گرفته شده‌اند، عبارت بودند از: غلظت اولیه ایزواوژنول، غلظت اولیه بیومس سلولی بر حسب وزن خشک، سوبستراهای کمکی (گلیسرول، عصاره مخمر و تریپتون)، غلظت اولیه‌ی نمک سدیم کلراید و یون‌های فلزی (مس، روی و کبالت). برای موارد متغیر مذکور، آرایه‌ی متعامد مناسب L18 [5^{3} (سطح) (متغیر)] طراحی شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار شد. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار Qualitek-4 انجام شده، با استفاده از روش آماری ANOVA، پارامترهای درجه آزادی، مجموع مربعات، F پارامتر، واریانس آماری و درصد سهم هر فاکتور در تولید میکروبی وانیلین تعیین شده است.



شکل شماره ی ۱. کروماتوگرام حاصل از تزریق مخلوط محلول های استاندارد ایزواوژنول و وانیلین به وسیله‌ی دستگاه HPLC

نتایج

بهینه‌سازی آماری با روش تاگوچی

در این پژوهش، طراحی آزمایش‌ها طبق روش آماری تاگوچی صورت گرفت. پیش از طراحی، متغیرهای مؤثر شناسایی شده و سطوح مورد نظر آنها تعیین شدند. هدف از استفاده از روش طراحی آزمایش به روش تاگوچی، تشخیص تأثیر هر یک از متغیرهای فردی روی تولید وانیلین، بررسی تأثیر متقابل متغیرها روی تولید وانیلین، تعیین شرایط بهینه و تخمین میزان تولید وانیلین از ایزواوژنول تحت شرایط بهینه، پیش‌بینی شده است. در این راستا، تأثیر پنج متغیر بیومس سلولی (بر حسب وزن خشک سلولی)، غلظت اولیه ایزواوژنول (بر حسب درصد حجمی/حجمی)، یون‌های فلزی (یون‌های مس، روی و کبالت هر کدام در غلظت نهایی ۵۰ میلی گرم در لیتر)، سوبستراهای کمکی (گلیسرول، عصاره مخمر و تریپتون هر کدام در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) و غلظت اولیه سدیم کلراید (بر حسب درصد وزنی/حجمی) بر تولید وانیلین تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت *Psychrobacter* sp. CSW4 بررسی شد (جدول شماره‌ی ۱). لازم به ذکر است که تمامی آزمایش‌های تحت شرایط دمایی و دور شیکر 28 درجه‌ی سانتی گراد، 200 rpm و مدت زمان انکوباسیون 24 ساعت انجام شد.

جدول شماره‌ی ۱. متغیرهای مورد آزمایش، سطوح و مقادیر آن‌ها

Variable	Level 1	Level 2	Level 3
Dry biomass (g/l)	2	4	6
Isoeugenol (g/l)	1	2.5	5
Co-substrates (100 mg/l)	Glycerol	Yeast extract	Trypton
NaCl (% w/v)	0	5	10
Metal ions (50 mg/l)	Zn	Cu	Co

با توجه به تعداد متغیرها، سطوح و تأثیر متقابل دوتایی بین متغیرها، درجه‌ی آزادی برابر ۱۷ است که لزوم انتخاب آرایه‌ی متعامد L18 (انجام ۱۸ آزمایش مختلف) را به عنوان یک آرایه‌ی استاندارد ایجاب می‌کند (جدول شماره‌ی ۲). در جدول فوق غلظت‌های وانیلین تولیدی در ۱۸ آزمایش مختلف اجرا شده ارائه شده است. نتایج نشان داد که مقدار وانیلین براساس اثر ترکیبی فاکتورهای انتخاب‌شده در محدوده‌ی بین ۸۴ تا ۱۰۱۰ میلی گرم در لیتر است (جدول شماره‌ی ۲).

جدول شماره‌ی ۲. آرایه‌ی متعامد L18

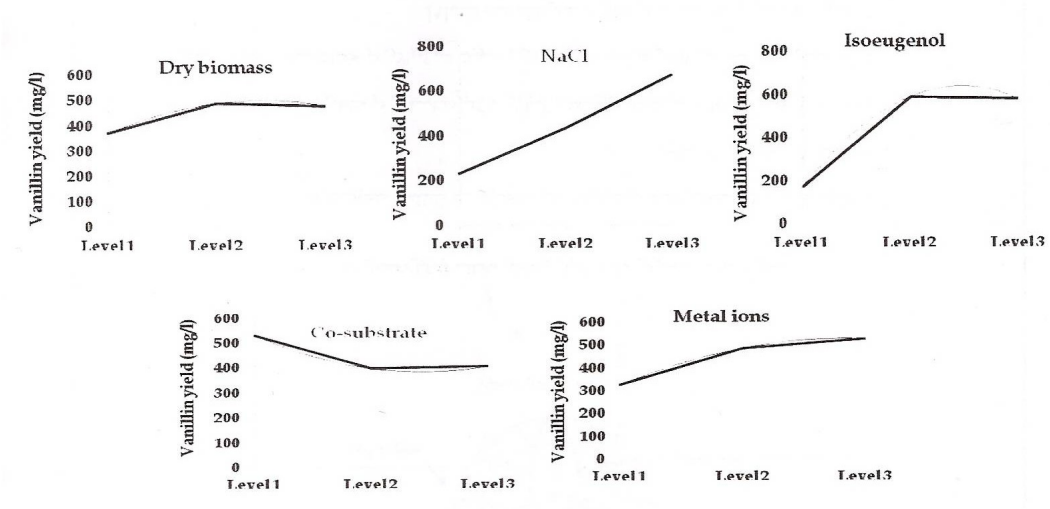
Serial no.	1 (Dry Biomass)	2 (Isoeugenol)	3 (Co-substrate)	4 (NaCl)	5 (Metal ions)	Vanillin (mg/l)
1	1	1	1	1	1	170
۲	۱	2	۲	۲	۲	568
۳	۱	3	۳	۳	۳	916
۴	2	1	۱	2	۲	248
۵	2	۲	۲	3	۳	996
۶	2	3	۳	1	۱	102
۷	3	۱	2	1	3	84
۸	3	2	3	2	1	583
۹	3	3	1	3	2	1010
۱۰	1	۱	3	۳	2	216
۱۱	1	2	1	۱	3	154
۱۲	1	3	2	۲	1	196
۱۳	2	1	2	3	1	183
۱۴	2	۲	3	1	2	513
۱۵	۲	3	1	2	3	894
۱۶	3	۱	3	2	3	112
۱۷	3	2	1	3	1	717
۱۸	3	3	2	1	2	360

اثر اصلی هر یک از متغیرهای فردی بر تولید وانیلین در شکل (2) نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، مقادیر بالاتری از وانیلین در سطوح سه سدیم کلراید (غلظت ۱۰ درصد وزنی/حجمی) و یون‌های فلزی (یون کبالت) و همچنین در سطح یک سوبستراهای کمکی (گلیسرول) مشاهده شده است. سطح مناسب برای دو متغیر دیگر، یعنی ایزواوژنول (۲/۵ گرم در لیتر) و بیومس سلولی (۴ گرم در لیتر) سطح ۲ است. در واقع، با بررسی اثرهای اصلی هر کدام از پارامترهای مورد مطالعه می‌توان روند کلی تأثیر متغیرها را بر فرایند مورد نظر تمایز داد. با استفاده از روش تاگوچی می‌توان اثر متقابل (اینترکشن) بین دو فاکتور مختلف را بررسی نمود. نتایج در جدول شماره‌ی ۳ ارائه شده است. در واقع، با مطالعه‌ی اینترکشن‌ها می‌توان نتیجه گرفت که تولید یک محصول خاص، بر حسب اینترکشن بین فاکتورها متفاوت است و تأثیر یک فاکتور متأثر از سطح فاکتور دیگری است (Venkata et al, 2003). همان‌گونه که در جدول شماره‌ی ۳ مشاهده می شود، در مجموع ۱۰ اینترکشن مشاهده شده است که بالاترین میزان اینترکشن (28.25 درصد) بین دو فاکتور بیومس سلولی و ایزواوژنول است. جالب است که فاکتور بیومس سلولی دارای کمترین تأثیر بر تولید وانیلین به صورت فردی است که خود بیانگر این مطلب است که اثر یک فاکتور روی تولید وانیلین کاملاً وابسته به شرایط فاکتورهای دیگر در فرایند بهینه‌سازی تولید وانیلین است.

جدول شماره‌ی ۳. ده اینترکشن تخمین زده شده به وسیله‌ی نرم افزار Qualitek-4

#	Interacting Factor Pairs (Order based on SI)	Columns	SI(%)	Col	Opt.
1	Dry Biomass x Isoeugenol	2 x 3	28.25	1	[2,2]
2	Isoeugenol x Co-substrate	3 x 4	25.77	7	[3,1]
3	Co-substrate x NaCl	4 x 5	17.74	1	[1,3]
4	NaCl x Metal Ions	5 x 6	16.84	3	[3,3]
5	Dry Biomass x Co-substrate	2 x 4	14.36	6	[3,1]
6	Isoeugenol x NaCl	3 x 5	11.3	6	[3,3]
7	Isoeugenol x Metal Ions	3 x 6	10.22	5	[3,3]
8	Co-substrate x Metal Ions	4 x 6	10.12	2	[1,2]
9	Dry Biomass x NaCl	2 x 5	3.1	7	[3,3]
10	Dry Biomass x Metal Ions	2 x 6	1.71	4	[2,3]

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از روش تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد که نتایج در جدول ۴ ارائه شده است. همان‌گونه که در جدول مشاهده می‌شود، غلظت ایزواوژنول و نمک سدیم کلراید دارای بیشترین تأثیر بر تولید وانیلین بوده‌اند، در مقابل کمترین تأثیر را یون‌های فلزی، سوبستراهای کمکی و بیومس سلولی داشتند. فاصله اطمینان محاسبه‌شده برای دو فاکتور با تأثیرپذیری بالا، یعنی ایزواوژنول و نمک سدیم کلراید به ترتیب ۹۷/۶ و ۹۶/۴ درصد تخمین زده شد.



شکل شماره‌ی ۲. اثر فاکتورهای فردی در سطوح مختلف بر بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت *Psychrobacter* sp. CSW4

جدول شماره۴. Anova

Col # / Factor	DOF (f)	Sum of Sqrs. (S)	Variance (V)	F - Ratio (F)	Pure Sum (S')	Percent P(%)
2 Dry Biomass	2	51937.334	25968.667	.486	0	0
3 Isoeugenol	2	689964.464	344982.232	6.464	583233.511	30.578
4 Co-substrate	2	67592.511	33796.255	.633	0	0
5 NaCl	2	588751	294375.5	5.516	482020.046	25.272
6 Metal Ions	2	135522.352	67761.176	1.269	28791.399	1.509
Other/Error	7	373558.335	53365.476			42.641
Total:	17	1907326				100.00%

تعیین شرایط بهینه

برای تعیین شرایط بهینه از آنالیز Bigger to Better استفاده شد. سطح مطلوب، میزان تأثیرپذیری و همچنین بیشترین میزان وانیلین تولیدی پیش‌بینی‌شده تحت شرایط بهینه در جدول ۵ نشان داده شده است. همان‌گونه که در جدول مشاهده می‌شود، فاکتورهایی مانند سدیم کلراید و ایزواوژنول نسبت به دیگر فاکتورها دارای تأثیرپذیری بیشتر در بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین بوده‌اند. مقدار وانیلین پیش‌بینی‌شده تحت

شرایط بهینه، حدود 1026 میلی گرم در لیتر بوده است (جدول شماره‌ی ۵).

جدول شماره‌ی ۵. شرایط بهینه و مقدار وانیلین تولیدی پیش‌بینی‌شده با نرم‌افزار Qualitek-4

Column # / Factor	Level Description	Level	Contribution
2 Dry Biomass	4	2	43.666
3 Isoeugenol	2.5	2	142.833
4 Co-substrate	Glycerol	1	86.5
5 NaCl	10	3	227.333
6 Metal Ions	Co	3	80.333
Total Contribution From All Factors.....			580.665
Current Grand Average Of Performance...			445.666
Expected Result At Optimum Condition...			1026.331

انجام آزمایش تأییدی

در این مرحله میزان وانیلین تولیدی پیش‌بینی‌شده تحت شرایط بهینه، با میزان وانیلین به دست‌آمده در همین شرایط با یکدیگر مقایسه می‌شود و چنانچه در فاصله‌ی مطلوب قرار گیرد، طراحی آزمایش درست و بهینه‌سازی به پایان می‌رسد. به همین دلیل آزمایشی طبق جدول شماره‌ی ۶ به اجرا درآمد.

جدول شماره‌ی ۶. میزان تولید بیووانیلین بعد از فرآیند بهینه‌سازی با استفاده از روش تاگوچی

Dry Biomass	Isoeugenol	Glycerol	NaCl	Co	Observed vanillin (mg/L)
4 g/L	2.5 g/L	100 mg/L	100 g/L	50 mg/l	1016

همان‌گونه که از جدول شماره‌ی ۶ مشخص است، میزان وانیلین تولیدی به دست آمده (۱۰۱۶ میلی گرم در لیتر) با میزان وانیلین تولیدی پیش‌بینی‌شده (۱۰۲۶ میلی‌گرم درلیتر، جدول ۵) در فاصله‌ی مطلوب قرار گرفته است. بر اساس یافته‌های حاصل از بهینه‌سازی بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین با استفاده از روش آماری تاگوچی، سلول‌های در حال استراحت سویه *Psychrobacter* sp. CSW4 پتانسیل تبدیل ۲/۵ گرم در لیتر از سوبسترای ایزواوژنول را به 1.016 گرم در لیتر وانیلین پس از گذشت به ترتیب ۲۴ ساعت از شروع واکنش بیوترانسفورماسیون داراست. در این تحقیق راندمان مولی تهیه وانیلین طبیعی از ایزواوژنول 43.8 درصد بوده است. راندمان مولی حاصل، از رابطه‌ی زیر تخمین زده شده است:

Molar yield (%) = [g vanillin produced × mol wt of Isoeugenol/ g Isoeugenol added × mol wet of vanillin] × 100.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه وانیلین به عنوان یک حد واسط اصلی در مسیر تجزیه‌ی ایزواوژنول ایجاد می‌شود، تحقیقات گسترده‌ای در سال‌های اخیر با هدف

تهیه‌ی وانیلین طبیعی از سوبسترای پیش‌ساز ایزواوژنول صورت گرفته است. سوبسترای ایزواوژنول در گروه ۱- پروپنیل بنزن ها طبقه‌بندی‌شده است و به عنوان یک پیش‌ساز ارزان قیمت طبیعی، از جذابیت بالایی در فرایندهای بیوترانسفورماسیون برخوردار است. هدف از پژوهش اخیر بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت با استفاده از روش آماری تاگوچی جهت یافتن ترکیب بهینه‌ی فاکتورهای مؤثر به منظور بهبود بیوترانسفورماسیون سوبسترای ایزواوژنول به وانیلین تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت سویه بومی *Psychrobacter* sp. CSW4 بود. در این راستا، پنج متغیر ایزواوژنول، نمک سدیم کلراید، سوبستراهای کمکی، یون‌های فلزی و بیومس سلولی انتخاب و از طرح آزمایش تاگوچی L18 برای مطالعه‌ی فاکتورها و تعاملات بین آن‌ها استفاده شد. براساس نتایج به دست‌آمده، عوامل با تأثیر معنی‌داری بر بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین به ترتیب اهمیت غلظت اولیه نمک سدیم کلراید، غلظت اولیه ایزواوژنول، سوبسترای کمکی گلیسرول، یون فلزی کبالت و غلظت اولیه بیومس سلولی تعیین شدند. تحت شرایط بهینه در سطوح انتخاب‌شده این فاکتورها، ماکزیمم غلظت وانیلین در سطح معنی‌داری ۱٪ ($p< 0.01$) ۱/۰۱۶ گرم در لیتر (با راندمان مولی ۴۳/۸ درصد) پس از ۲۴ ساعت واکنش زیست تبدیلی تخمین زده شده است. نتایج نشان داد که طراحی تاگوچی ابزاری قدرتمند برای بهینه‌سازی و بهبود بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین در سویه بومی مورد مطالعه بوده است، زیرا در مطالعه‌ی قبلی که آشنگرف و همکارانش (۲۰۱۲) انجام داده‌اند، بیشترین میزان وانیلین تولیدی تحت سلول‌های در حال استراحت سویه بومی غربالگری شده *Psychrobacter* sp. strain CSW4، ۱۴۱/۴۵ میلی‌گرم در لیتر با راندمان مولی ۱۶/۴ تحت شرایط بهینه نشده بوده است که پس از بهینه‌سازی انجام شده با روش تاگوچی این میزان به ۱/۰۱۶ گرم در لیتر با راندمان مولی ۴۳/۸ درصد افزایش یافته است.

در سال‌های اخیر تحقیقات وسیعی در ارتباط با بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین صورت پذیرفته است. با توجه به اینکه راندمان تولید وانیلین در بیشتر فرایندهای مطالعه‌شده در اثر اکسیداسیون وانیلین به وانیلیک اسید و یا احیای آن به وانیلیل الکل پایین گزارش شده است (Overhage و همکاران ۱۹۹۹). در بیشتر تحقیقات صورت گرفته از استراتژی‌های مختلف از جمله بهینه‌سازی شرایط بیوکانورژن، استفاده از عصاره‌های عاری از سلول، اضافه نمودن رزین‌های اختصاصی جذب وانیلین و همچنین به کارگیری سیستم‌های دو فازی (آب و حلال‌های آلی) جهت بهبود راندمان وانیلین تولیدی استفاده شده است. در اولین گزارش منتشرشده، غلظت و راندمان مولی وانیلین ایجادشده از ایزواوژنول به وسیله‌ی سویه *Aspergillus niger* ATCC9142 به ترتیب ۰.۰۸ گرم در لیتر و ۱۰ درصد بوده است (Abraham و همکاران ۱۹۸۸). Rabenhorst و Hopp (1991) فرآیندی را با هدف سنتز وانیلین از ایزواوژنول با استفاده از سویه *Serratia marcescence* DSM30126 توسعه دادند. راندمان اولیه وانیلین تولیدی توسط این

سویه فقط ۵ درصد بوده که پس از بهینه سازی به ۲۰.۵ درصد پس از ۲۱۶ ساعت دوره انکوباسیون افزایش یافته است. در مطالعه‌ی دیگری به وسیله‌ی Shimoni و همکارانش (2000) توسط سویه *Bacillus subtilis* B2، غلظت وانیلین تولیدی تحت سلول‌های رویشی ۰.۶۱ گرم در لیتر با راندمان مولی ۱۲.۴ درصد بوده که پس از استفاده از عصاره‌ی عاری از سلول، این میزان به ۰.۹ گرم در لیتر افزایش یافته است. در مطالعه‌ی دیگری با استفاده از ۶۰ درصد حجمی/حجمی ایزواوژنول (هم به عنوان سوبسترا و هم به عنوان حلال) وانیلین در غلظت ۳۲.۵ گرم در لیتر به وسیله‌ی سویه *Bacillus fusiformis* SW-B9 تولید شده است. راندمان مولی این فرآیند تنها ۵.۸ درصد بود (Zhao و همکاران ۲۰۰۵). Zhao و همکارانش (۲۰۰۶) گزارشی از سویه *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 با قابلیت بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین منتشر کردند. میزان تولید وانیلین در سویه مذکور در حالت طبیعی بسیار ناچیز بود. پس از اضافه نمودن ۱۲.۵ گرم درلیتر رزین اختصاصی HD-8، غلظت وانیلین به ۸.۱ گرم درلیتر از ۵۰ گرم در لیتر ایزواوژنول پس از ۷۲ ساعت واکنش بیوکانورژن رسید. راندمان مولی این پروسه ۱۷.۴ درصد بوده است. در سال ۲۰۰۷، Yamada و همکارانش به وسیله‌ی استراتژی سلول‌های درحال استراحت *Pseudomonas putida* IE27 تحت شرایط بهینه‌شده و درحضور ۱۰ درصد دی متیل سولفوکساید (DMSO) موفق به دستیابی ۱۶.۱ گرم درلیتر وانیلین با راندمان مولی ۷۱ درصد پس از ۲۴ ساعت واکنش بیوکانورژن شدند. تا به امروز بالاترین راندمان وانیلین تولیدی از ایزواوژنول مربوط به همین مطالعه می‌باشد. علیرغم راندمان مولی بالای واکنش فوق، با توجه به استفاده از حلال آلی غیرمجاز DMSO که دارای قطبیت بالا و نقطه جوش بالا بوده و این امر جداسازی کامل آن را از وانیلین تولیدی در مخلوط واکنش زیست تبدیلی تقریبا غیرممکن می‌سازد، بنابراین از فرایند اخیر نمی‌توان در مقیاس صنعتی با هدف تولید وانیلین طبیعی استفاده نمود. براساس نتایج حاصل از این تحقیق، چنانچه بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت جهت بالانس نمودن رشد سلولی و میزان تولید وانیلین انجام گیرد، می‌توان به راندمان‌های پذیرفتنی بدون استفاده از مواد سمی غیرمجاز و یا اضافه نمودن موادی که مستلزم صرف هزینه‌های بالای اقتصادی هستند، دست یافت. بنابراین انجام تحقیقات مشابه این پژوهش و استفاده ازیافته های حاصل می‌تواند زمینه‌ساز کار و تحقیق بیشتر در زمینه‌ی استفاده از روش‌های بهینه‌سازی برای تولید بیووانیلین در سویه‌های مشابه با هدف تولید مطلوب وانیلین گردد.

منابع

Abraham, W.R., Arfmann, H.A., Stumpf, B., Washausen, P. and Kieslich, K. (1988) Microbial transformations of some terpenoids and natural compounds. In: P. Schreier, Editor, Bioflavour’ 87, Analysis, Biochemistry, Biotechnology, Proc. Int. Conf. Walter de Gruyter, Berlin Pp 399–414.

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.

Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. and Momenbeik, F. (2011) Use of growing cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the natural vanillin via conversion of isoeugenol. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 10 (4): 749-757.

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.

Burri, J., Graf, M., Lambelet, P. and Loliger J. (1989) Vanillin: more than a flavouring agent—a potent antioxidant. Journal of the Science of Food and Agriculture 48: 49– 56.

Chatterjee, T., De, B.K. and Bhattacharyya, D.K. (1999) Microbial conversion of isoeugenol to vanillin by *Rhodococcus rhodochrous*. Indian Journal of Chemistry 38: 538–541.

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.

Han, J.J., Yang, T.H. and Rhee, J.S. (1998) Optimization of reaction variables for sucrose monoester production using lipase in a solvent free system by Taguchi's method. Biotechnology Techniques 12: 295–299.

Kasana, R.C., Sharma, U.K., Sharma, N. and Sinha, A.K. (2007) Isolation and identification of a novel strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of transforming isoeugenol to vanillin. Current Microbiology 54: 457-461.

Krings, U. and Berger, R.G. (1998) Biotechnological production of flavors and fragrances. Applied Microbiology and Biotechnology 49: 1–8.

Matamoros-Leon, B., Argaiz, A. and Lo´pez-Malo, A. (1999) Individual and combined effects of vanillin and potassium sorbate on *Penicillium digitatum*, *Penicillium glabrum*, and *Penicillium italicum* growth. Journal of Food Protection 62: 540–542.

Mohapatra, P.K.D., Maity, C., Rao, R.S., Pati, B.R. and Mondal, K.C. (2009) Tannase production by *Bacillus licheniformis* KBR6: optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. Food Research International 42: 430 – 435.

Overhage, J., Priefert, H., Rabenhorst, J. and Steinbuchel, A. (1999) Biotransformation of by disruption of the vanillin dehydrogenase (*vdh*) gene. Applied Microbiology and Biotech-nology 52: 820–828

Priefert, H., Rabenhorst, J. and Steinbuchel, A. (2001) Biotechnological production of vanillin. Applied Microbiology and Biotechnology 56: 296-314.

Rabenhorst, J. and Hopp, R. (1991) Process for the preparation of vanillin. US Patent 5017388.

Rao, R.S., Kumar, G.C., Prakasham, S.R. and Hobbs, P.J. (2008) The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: a critical appraisal. Biotechnology Journal 3: 510–523.

Seshadri, R., Lamm, A.S., Khare, A. and Rosazza, J.P.N. (2008) Oxidation of isoeugenol by *Nocardia iowensis*. Enzyme and Microbial Technology 43: 486–494.

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.

Venkata, D. V., Panda, T. and Chidambaram, M. (2003) Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method. Process Biochemistry 38: 877– 880.

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

Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T. and Nagasawa, T. (2007) Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells. Applied Microbiology and Biotechnology 73: 1025 – 1030.

Zhao, L.Q., Sun, Z.H., Zheng, P. and He, J. Y. (2006) Biotransformation of isoeugenol to of resin H D-8. Process Biochemistry 41: 1673–1676.

Zhao, L.Q., Sun, Z.H., Zheng, P. and Zhu, L.L. (2005) Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a novel strain of *Bacillus fusiformis*. Biotechnology Letters 27: 1505–1509.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.