بیوترانسفورماسیون وانیلین به وانیل الکل توسط جلبک *Chlorella Vulgaris*

معصومه حسین‌زاده [۱،۲]*، علی گنجیان خناری [۲و۳]

۱-استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی – واحد قائم‌شهر، ایران
۲-گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی دریای خزر(کاسپین) ، وزارت علوم،تحقیقات و فناوری،ساری، ایران.

۳- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقاتی علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی، ساری،ایران

ma_hosseinzadeh@yahoo.com

چکیده

تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها توانایی تبدیل اکسیداسیون و احیا ترکیبات شیمیایی را دارند. در این تحقیق با استفاده از میکروجلبک کلرلا ولگاریس بعد از لوگ رشد (رشد تصاعدی) در شراط آزمایشگاهی وانیلین که دارای گروه کربونیل هست به وانیل الکل که دارای گروه الکل هست احیا و جدا سازی شد. میکروجلبک کلرلا در حجم کم داخل ارلن، کشت داده شد وحجم‌های مختلفی از وانیلین که بهترین مقدار ۰,۱ گرم در ۱ میلی‌لیتر متانول حل نموده و به نمونه تزریق شد و بعد از چهار روز نمونه‌ها استخراج شدند و به کمک دستگاه GCMASS شناسایی شده‌است. نتایج بدست آمده ۸۰ درصد وانیلین به محصول وانیل الکل تبدیل شده است. مطالعه اخیر نخستین گزارش از کاربرد میکرو جلبک کلرلا ولگاریس در تولید وانیل الکل از وانیلین محسوب می‌شود.

واژه های کلیدی:کلرلا ولگاریس ، وانیلین ، وانیل الکل و GCMASS

مقدمه

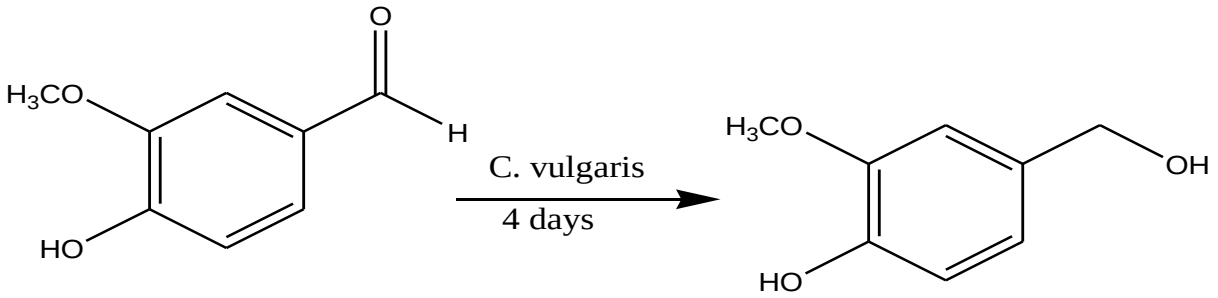
مزایای میکروجلبک‌ها و پتانسیل بالا آنها در صنایع مختلف که دارای هستند از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشند. زمین-های حاشیه‌ای و آب‌هایی (تحمل شوری) که مناسب زراعت نیستند می‌تواند برای رشد میکروجلبک‌ها مورد استفاده قرارگیرند. و به سبب نرخ رشد بالا، زمان رشد کوتاه‌تر، چربی و پروتئین بالاتر مورد توجه زیاد هستند. (Wawrik & Harriman, ; Violeta *et al.*, ۲۰۱۱ ۲۰۱۰).

جلبک‌ها قادرند طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی را تولید نمایند که بسته به نوع جلبک تولید این ترکیبات متفاوت‌اند. انواع مختلفی از آنتی‌اکسیدان‌ها، اسیدهای چرب غیراشباع، ترکیبات موثر دارویی، پروتئین، ترکیبات ضد ویروس، ضد باکتری و ضدقارچ از جمله ترکیبات ارزشمندی هستند که توسط جلبک‌ها تولید می‌شود. برخی از جلبک‌ها منبع آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند و مانع از رشد دیگر باکتری‌ها می‌گردد، به‌عنوان مثال می‌توان از آنتی بیوتیک Chlorellin نام برد که در جلبک *Chlorella* یافت می‌شود(Tanaka K *et al.*,۱۹۸۶, گنجیان ۱۳۹۶).

پژوهش‌هایی در زمینه تصفیه فلزات سنگین(Jones *et al.*, ۲۰۱۵)، مکانیسم اکسیداسیون و احیا ترکیبات معدنی از جمله آرسنیک (Zouboulis *et al.*, ۲۰۰۵); و متیلاسیون و دمتیلاسیون ترکیبات شیمیایی(Stolz *et al.*,۲۰۰۶) و کاربردهای دیگر از جمله مواردی است که روی این جلبک صورت گرفته‌است.

وانیل الکل یک ترکیب فنولی هست که خاصیت آنتی‌اکسیدان زیادی دارد (Silva *et al* ., ۲۰۰۶) و همچینین خاصیت دارویی از جمله؛ اثر ضد تشنجی(Sasaki *et al.*, ۱۹۹۰)، اثر آنژیوژنیک (Rupasinghe *et al.*, ۲۰۰۵)، اثر ضددردی و ضد

التهاب(Tai *et al.*, ۲۰۱۱) دارد که نشان‌دهنده اثر درمانی قابل قبول آن در برخی از داروها است (Hsieh *et al.*, ۲۰۰۰ , Jung *et al* ۲۰۰۰).



شکل ۱: وانیل الکل که از وانیلین به‌وسیله جلبک کلرلا سنتز گردید

مواد و روش ها

میکرو اورگانیسم و محیط کشت

در این بررسی جلبک کلرلا ولگاریس از گروه پژوهشی شیلات و آلاینده‌های آبی خزر(کاسپین) تهیه شد و در ارلن مایر ml ۲۵۰ با ml ۱۰۰ محیط کشت (BBM) شامل (g/L) : NaNO۳ (۰,۲۵), K۲HPO۴ (۰,۰۷۵), KH۲PO۴ (۰,۱۷۵), NaCl (۰,۰۲۵), CaCl۲,۲H۲O (۰,۰۲۵), MgSO۴۷H۲O (۰,۰۷۵), EDTA.۲Na (۰,۰۵), KOH (۰,۰۳۱), FeSO۴۷H۲O (۰,۰۰۵), H۳BO۳ (۰,۰۰۸), ZnSO۴۷H۲O (۰,۰۰۱۵), MnCl۲,۴H۲O (۰,۰۰۰۳), MoO۳ (۰,۰۰۰۲۵), CuSO۴۵H۲O (۰,۰۰۰۳), Co(NO۳)۲۶H۲O (۰,۰۰۰۱) در قفسه کشت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد با زمان نوردهی توسط تایمر اتوماتیک به صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم شد(Priefert *et al.*, ۲۰۰۱).

بعد از اینکه جلبک‌ها خوب رشد کردند(لوگ رشد) ۰,۱ گرم وانیلین که در ۱ میلی‌لیتر متانول حل گردید را به ارلن اضافه شد و۱۲ ارلن آماده برای تیمار و شاهد که همه مواد وجود داشت به جز وانیلین پس از ۴ روز با دستگاه سانتریفوژ جلبک‌ها را جدا شده و با آب مقطر شسته و با دی‌کلرومتان استخراج و با دستگاه روتاری حلال پراکنی و با TLC چک گردید بعد باقیمانده مواد را در متانول حل و به دستگاه GCMASS تزریق گردید.

نتایج و بحث

استفاده از فرآورده‌های طبیعی برای تامین نیازهای بشر، به‌عنوان یک راهکار سالم و مهم در زندگی ماشینی امروز مطرح شده و در این میان جلبک‌ها از سودمندترین و کارامدترین تولیدکنندگان جامعه گیاهی هستند (Wijffels and Barbosa ۲۰۱۰). صرفه‌جویی اقتصادی با تاکید بر مصرف بهینه مواد اولیه، دلیل بسیار خوبی برای رشد و توسعه منابع جلبکی می‌باشد(Pulz and Gross, ۲۰۰۴; Richmond, ۲۰۰۴ Habib, ۲۰۰۸ ، اکبری و مددکار حق جو۱۳۹۷).

نتایج حاصل از این آزمایش در حجم‌های مختلف از وانیلین انجام شد (۰,۰۱ و۰,۰۵ و ۰,۱) بهترین نتیجه غلظت ۰,۱ بوده که در شکل ۲ با کاغذ TLCچک شده‌است. در روی این کاغذ در روزهای مختلف مقدار کمی از نمونه گرفته و با کاغذ چک می‌گردید که در روزهای دوم و سوم اثری از محلول نبوده‌است و در روز چهارم محصول آشکار شده است در روز پنجم هم

محصول دیده نمیشود که نشان می‌دهد بهترین زمان برای این ماده چهار روز هست. سپس این غلظت ۰,۱ را گرفته در روزهای مختلف انجام شد که بهترین زمان ۴ روز بوده‌است بعد از تثبیت زمان و مقدار وانیلین در حجم‌های زیاد گذاشته شده و بعد از استخراج به دستگاه GCMASS تزریق شد و در شکل های ۳و۴ نشان داده شده‌است. با توجه به نتایج طیف اول ما ماده خالص که وانیلین می‌باشد به دستگاه تزریق میکنیم که طیف به دست آمده در شگل ۳ مشخص شده حدودا در رنج ۱۴,۵۶ بعد به دستگاه محصول تزریق می‌شود که طیف محصول در رنج ۱۴,۹ آشکار شده است با بررسی به‌عمل آمده ۶۳ در صد وانیلین به محصول وانیل الکل تبدیل شده‌است .

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	peak area	peak % max.	% of total
۱	۱۴,۶۰۹	۱۴,۲۰۶	۱۴,۸۴۶	BV	۷۴۲۶۷	۵۳۴۳۴۹۸	۵۷,۳۱٪	۳۶,۴۳۰٪
۲	۱۴,۹۱۸	۱۴,۸۴۶	۱۵,۲۷۳	VB	۲۰۶۷۷۰	۹۳۲۴۱۹۵	۱۰۰,۰۰٪	۶۳,۵۷۰٪

Sum of corrected areas: ۱۴۶۶۷۶۹۳

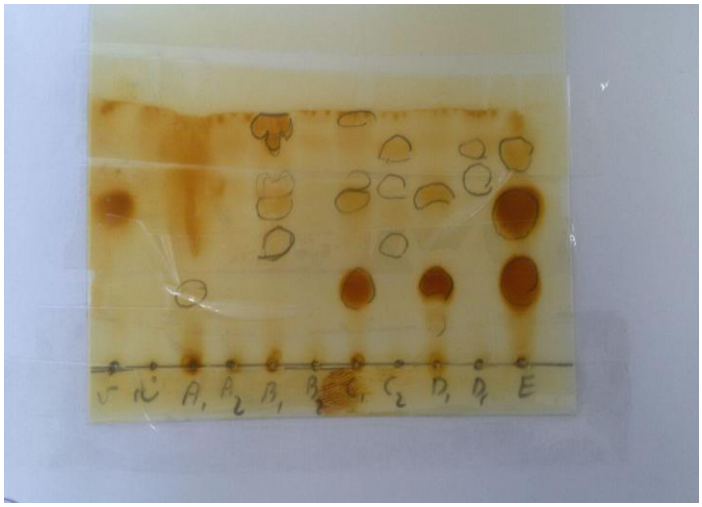
تا کنون کارهای زیادی در این مورد انجام شد. اولین کار انجام شده ایزوائوگنول (Isoeugenol) را به وانیلین با استفاده از باکتری *Aspergillus niger* که بازده۱۰٪ بود (Abraham *et al.*, ۱۹۸۸) تبدیل شد و بعد آن با میکرو اورگانیسم‌های دیگر ازجمله strain *Bacillus subtilis* که بازده محصول بین ۱۲ تا ۱۴ درصد بود انجام گردید (Shimoni *et al.*, ۲۰۰۰ . بالاترین مجصول ۵۸ درصد با استفاده از باکتری *Rhocodoccus rhodochrous* گزارش شد (Zhang *et al.*, ۲۰۰۶) .

در تحقیق اشنگرف و نحوی (۱۳۹۵) با باکتری نوترکیب استرپتوکوکوس ترموفیلوس قادر به تبدیل اسیدفرولیک به وانیلین با راندمان مولی ۶۲ درصد پس از ۱۲ ساعت واکنش، و وانیلین الکل با راندمان مولی ۱۸ درصد، پس از ۱۶ ساعت واکنش زیست تبدیلی بود(آشنگرف و نحوی ۱۳۹۵).

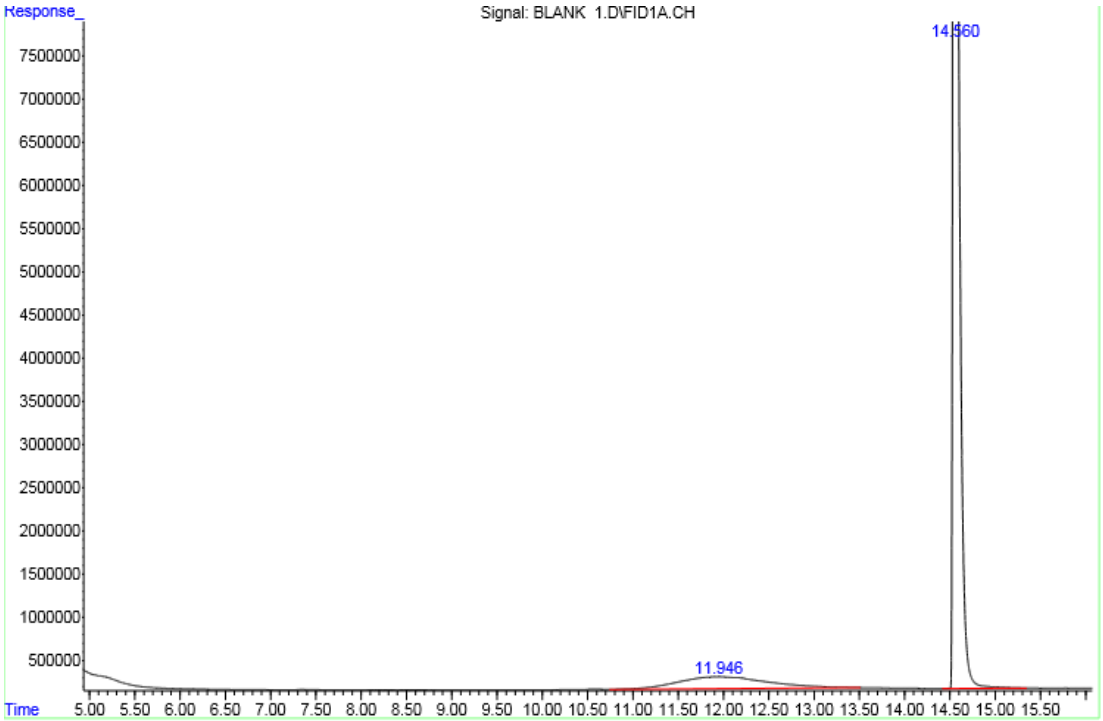
با توجه به شکل ۱ در این مقاله وانیلین به وانیلین الکل احیا شد تحت شرایط خاص به کمک جلبک کلرلا ولگاریس و احیا وانیلین به وانیلین الکل تحت شرایط تاریکی و روشنایی انجام شد. در این مقاله جلبک توانست بیوترانسفور را انجام دهد.

نتایج حاصل در این مقاله نشان داد در بین غلظت‌های مختلف وانیلین مقدار ۰,۱ گرم در لیتر وانیلین بهترین نتیجه را داد و همچنین در روزهای مختلف اندازه گیری و استخراج شد که در ۴ روز بهترین محصول داشت که توانست ۶۳٪ وانیلین را به وانیل الکل تبدیل کند.

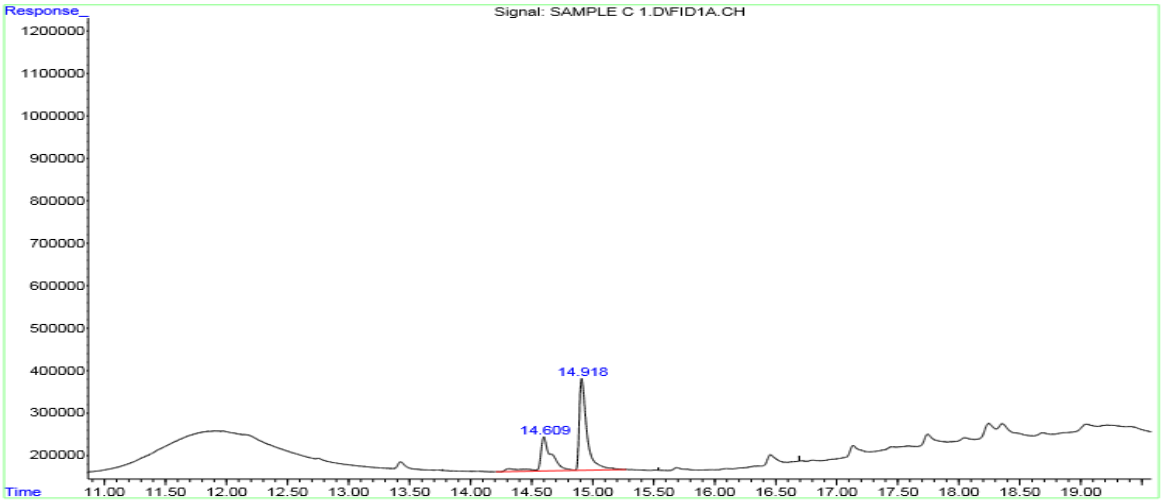
Algalmag



شکل۲: غلظت‌های مختلف وانیلین بر روی کاغذ TLC



شکل ۳: طیف GCMASS نمونه وانیلین



شکل ۴: طیف GCMASS آنیلین و وانیل الکل

تشکرو قدردانی

با تشکر از گروه پژوهشی شیلات و آلاینده های آبی خزر (کاسپین) امکانات این تحقیق را در اختیار ما قرار دادند.

منابع

آشنگرف مراحم و نحوی ایرج ۱۳۹۴. استرپتوکوکوس ترموفیلوس مهندسی شده برای سنتز وانیلین طبیعی و کاربرد آن در صنعت غذا. مجله علوم غذایی و تغذیه/پاییز ۱۳۹۵/سال سیزدهم/شماره ۴.

اکبری فروغ و مددکار حق جو مریم ۱۳۹۷. افزایش بیومس و رشد میکروجلبک *Dunaliella* تحت تاثیر تیمار وانیلین. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۷، شماره ۲۴، سال ۱۳۹۷.

گنجیان خناری ،علی. ۱۳۹۶. میکروجلبک طلای سبز آینده . انتشارات تحول، شماره کتابشناسی ملی ۴۵۲۶۸۸۰. ص۳۱۲

Abraham, W.R., Arfmann,H.A., Stumpf,B., *Microbial transformation of some terpenoids and natural compounds*. Analysis. Biochemistry. Berlin.(۱۹۸۸). PP ۳۹۹-٤١٤

Hsieh, C.H. Chang, S.Y. Chiang, T.C. Li, N.Y. Tang, C.Z. Pon, C.T. Hsieh, J.G. Lin, Life Sci. ٦٧ (٢٠٠٠) ١١٨٥–١١٩٥.

Habib, M. A. B., Parvin, M., Huntington, T. C., and Hasan, M. R. (٢٠٠٨) *A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish*. Food and Agriculture Organization of the United Nations ١٠٢٩: ١-٤٢.

Jung, S. Suh, H. Lee, I. Kim, H. Kim, H. Yoo, S. Lee, Phytother. Res. ٢١ (٢٠٠٧) ٩٦٠–٩٦٤.

Noma, Y., & Asakawa, Y. (١٩٩٨). *Biotechnology in agriculture and forestry*. In Y. P. S. Baji, Medicinal and aromatic plants X, Vol ٤١ Berlin: Springer.

Priefert H, Babenhorst J, Steinbuchel A (٢٠٠١) *Biotechnological production of vanillin*. Appl. Microbiol. Biotechnol. ٥٦: ٢٩٦–٣١٤.

Pulz, O., and Gross, W. (۲۰۰٤) *Valuable products from biotechnology of microalgae*. Applied Microbiology and Biotechnology ٦٥: ٦٣٥-٦٤٨.

Sasaki, Y.F., Ohta, T., Imanishi, H., Watanabe, M., Matsumoto, K., Kato, T., Shirasu, Y., ١٩٩٠. *Suppressing effects of vanillin, cinnamaldehyde, and anisaldehyde on chromosome aberrations induced by X-rays in mice*. Mutat. Res. ٢٤٣, ٢٩٩–٣٠٢

Simoni, E., Ravid, V., Shoham,Y. *Isolation of a bacillus sp capal of transformation isoeugenol to vanillin* . J. Biotechnol. (٢٠٠٠). ٧٨،١-٩

Silva, E. Odoux, P. Brat, F. Ribeyre, G. Jimenes, V. Olvera, M.A. Alvarado, Z. Gunata, Food Chem. ٩٩ (٢٠٠٦) ٧٢٨–٧٣٥.

Rupasinghe, H.P.Vasantha., Boulter-Bitzer, Jeanine., Ahn, Taehyun., Odumeru, Joseph.A., ٢٠٠٥. *Vanillin inhibits pathogenic and spoilage microorganisms in vitro and aerobic microbial growth in fresh-cut apples*. Food Res. Int. ٣٩, ٥٧٥– ٥٨٠.

Richmond, A. (٢٠٠٤) *Handbook of microalgal culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science. John Wiley and Sons.

Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., Ito, H., ٢٠١١. *Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays*. Biochim. Biophys. Acta ١٨١٠, ١٧٠–١٧٧.

Tanaka K., Koga T., Konishi F., Nakamura M., Mitsuyama M., Himeno K., Nomoto K., (١٩٨٦) Augmentation of host defense by a unicellular green alga, Chlorella vulgaris, to Escherichia coli infection, Infect. Immun. ٥٣ (١٩٨٦) ٢٦٧-٢٧١.

Zhang,Y.M., XU,P., Han,S., Yan,H.Q., *Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of bacillus subtilis H.* Appl.Microbioal.Biotecchnol (٢٠٠٦). ٧٣,٧٧١-٧٧٩.

Violeta Makarevičienė, Vaida Andrulevičiūtė, Virginija Skorupskaitėand Jūratė Kasperovičienė.(٢٠١١), *Cultivation of Microalgae Chlorella sp. And Scenedesmus sp. as a Potentional Biofuel Feedstock*. Environmental Research, Engineering and Management, No. ٣(٥٧), P. ٢١ – ٢٧ ISSN ٢٠٢٩-٢١٣٩ .

Wawrik, B., Harriman B.Rapid, *Colorimetric Quantification of Lipid from Algal Cultures*. The Journal of Microbiological Methods, ٢٠١٠, Vol. ٨٠, pp. ٢٦٢–٢٦٦.

Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., and Eppink, M. H. (٢٠١٠) *Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels.* Biofuels, Bioproducts and Biorefining ٤ (٣): ٢٨٧-٢٩٥.

Abstract

A large number of microorganisms including various microalgal strains are able to convert compounds into useful metabolotes .In this paper, the green synthesis using a Chlorella Vulgaris ability of transforming vanillin to vanillyl alcohol (VA) was isolated that VA was the main product was the results of this biotransformation. The incubation was carried out at ٢٥°C under continuous illumination in the present of ٠،١ $gL^{-١}$ of vanillin. After ٤ days incubation of the microalga in BG-١١ liquid medium, the broth was extract and the products were purified by the aid of chromatographic methods. Structure elucidation of the metabolites by preparative thin layer chromatography , gas chromatography–mass spectrometry and NMR. Chlorella Vulgaris reduced vanillin to the corresponding primary alcohols with a molar yield of ٨٢٪ that is the highest up to now to VA.

Keywords: Vanillin; vanillyl alcohol; Biotransformation, Microalgae and Chlorella Vulgaris.