تولید زیستی وانیلین طبیعی از سوبستراهای فنیل پروپانوئیدی به وسیله زیست تبدیلی با استفاده از سلولهای میکروبی

مراحم آشنگرف[1*] و ایرج نحوی[2]

[1] سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی

[2] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۶

چکیده

گرایش جوامع بشری برای مصرف فرآورده های معطر طبیعی موجب ترغیب محققین در استفاده از زیست واکنشگرهای میکروبی برای سنتز محصولات معطر طبیعی گردیده است. وانیلین به عنوان یکی از ترکیبات آروماتیک طبیعی به طور وسیعی در صنایع بهداشتی، آرایشی، غذایی، دارویی و پزشکی و به ویژه در صنعت طعم دهنده ها و خوشبوکننده ها به عنوان یکی از ترکیبات پایه از اهمیت به سزایی برخورداراست. دو روش عمده دستیابی به وانیلین طبیعی شامل استخراج مستقیم از منابع گیاهی و واکنشهای زیست تبدیلی میکروبی می باشد. با توجه به کاربرد گسترده وانیلین و افزایش روزافزون تقاضا برای مصرف وانیلین طبیعی و همچنین از آنجایی که استخراج از منابع گیاهی بسیار پرهزینه و زمان بر بوده و به تنهایی قادر به تأمین بازارهای جهانی نمی باشد، بنابراین لزوم توسعه فرآیندهای بیوتکنولوژیک جایگزین مناسب الزامی می باشد. زیست تبدیلی با استفاده از سلولهای میکروبی به طور وسیعی برای تغییرات در ساختار شیمیایی ترکیبات آلی مورد بهره برداری قرار گرفته است. سلولهای میکروبی به عنوان زیست واکنشگرهای کارآمد و سازگار با محیط زیست در تبدیل سوبستراهای به کار گرفته شده به عنوان پیش ساز، به ترکیبات طبیعی با ارزش افزوده بالا کاربرد دارند. در این مقاله مروری، کاربرد زیست تبدیلی میکروبی در تولید زیستی وانیلین طبیعی از پیش سازهای فنیل پروپانوئیدی (ایزواوژنول، اوژنول و اسید فرولیک) مورد مطالعه قرار گرفته است.

واژه های کلیدی: وانیلین طبیعی، زیست تبدیلی، سلولهای میکروبی، سوبستراهای فنیل پروپانوئیدی

* 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 زیست فناوری 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 (Biotransformation) می گویند. منظور از اصطلاح زیست تبدیلی میکروبی، استفاده از سلولهای کامل میکروبی (سلولهای رویشی (Growing cell)، سلولهای در حال استراحت (Resting cell) و اسپورها) یا آنزیمهایشان به عنوان زیست واکنشگر (Biocatalyst) برای تبدیل پیش سازهای طبیعی (Natural Precursor) به ترکیبات طبیعی با ساختار مشابه اما با ارزش افزوده بسیار بالا می باشد. در واقع میکروارگانیسم ها به عنوان زیست واکنشگر قادر به ایجاد ترکیبات شیمیایی خاص و با ارزش از طریق حذف، اضافه نمودن و یا اصلاح استخلاف های عاملی در جایگاههای مشخصی از سوبستراهای به کار گرفته شده به عنوان پیش ساز می باشند (۴۵). امروزه واکنشگرهای میکروبی به طور روزمره

در صنایع غذایی و به طور فزآینده ای در صنایع دارویی و شیمیایی برای سنتز مواد شیمیایی خاص و با ارزش، با پتانسیل صنعتی شدن، به کار گرفته می شوند. از فرآورده های با ارزش تولیدی از طریق واکنشگرهای میکروبی می توان به تولید اسیدهای آلی از ضایعات قندی، تصفیه فاضلابها و پسابها، تولید انواع ترکیبات استروئیدی، پروستاگلندین ها، انواع آنتی بیوتیکهای خاص، نگهدارنده های غذایی و همچنین تولید انواع ترکیبات معطر با ارزش اشاره نمود (۴۵). وانیلین یا ۴- هیدروکسی-۳- متوکسی بنزآلدئید با فرمول بسته $C_8H_8O_3$ از مهم ترین ترکیبات حلقوی معطر بو و مزه ساز اسانس وانیل می باشد. این ترکیب دارای بلورهای سوزنی شکل با دمای ذوب ۸۰ تا ۸۱ درجه سانتی گراد و دمای جوش ۲۸۵ درجه سانتی گراد است و دارای بوی شدید وانیل و طعم مشخص است. وانیلین در سال ۱۸۵۹ برای اولین بار توسط گوبلی از عصاره الکلی دانه وانیل استحراج شد (وانیل دانه درختی به نام وانیلا (Vanilla) از خانواده ارکیداسه (Orchidaceae) است). در سال ۱۸۷۲، کارلس موفق شد تا فرمول بسته این ترکیب را به دست آورد و در سال ۱۸۷۴ ساختمان آن توسط تایمن و هارمن تعیین گردید. در همان سال وانیلین توسط کمپانی هارمن و رایمر به صورت صنعتی سنتز شد (۵). وانیلین در بین 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 بوده که از نظر ارزشی معادل ۲۰ میلیارد دلار بوده و روند افزایشی سالیانه آن بین ۱۱ تا ۱۲ درصد برآورد شده که در این میان تقاضای جهانی برای مصرف وانیلین بیش از ۱۶۰۰۰ تن در سال بوده است (۷۴). در حال حاضر از وانیلین به طور گسترده در صنایع غذایی، دارویی و پزشکی، آرایشی و بهداشتی استفاده می شود (۷). از مصارف عمده وانیلین در صنایع غذایی می توان به موارد زیر اشاره نمود: الف) طعم دهنده و مزه ساز: از وانیلین برای بهبود طعم و مزه انواع شکلاتها، نوشیدنیهای الکلی و غیرالکلی، انواع نوشیدنیهای گازدار و بدون گاز، انواع شکلاتها، انواع بستنیها، انواع شیرینیها، محصولات نانوایی و غیره استفاده می شود (۲۵). ب) نگهدارنده غذایی: با توجه به اینکه بیشتر مواد غذایی تازه یا فرآوری شده در معرض آلودگیهای میکروبی قرار دارند، بنابراین همواره نیازمند راهی برای جلوگیری و کنترل این آلودگیها بوده، علی رغم تعدد در استفاده از انواع مواد شیمیایی طبیعی و یا مصنوعی به منظور به تعویق انداختن فساد مواد غذایی، در حال حاضر با توجه به خاصیت ضد میکروبی بالای وانیلین و همچنین عطر و بوی تند آن، از این ترکیب به عنوان نگهدارنده غذایی استفاده می شود (۲۵). تحقیقات نشان داده که این ترکیب در غلظت حدود ۲ گرم در لیتر می تواند باعث توقف رشد اکثر مخمرها و کپکهای فاسد کننده مواد غذایی شده و همچنین باعث ممانعت از رشد اکثر باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی می شود (۲۵). از وانیلین همچنین در ترکیب با سایر نگهدارنده های غذایی از جمله کیتوسان و پتاسیم سوربات استفاده شده که نتایج نشان داده اثرات ضد میکروبی ترکیبات مذکور به طور فزآینده ای افزایش پیدا کرده است (۴۸). ج) آنتی اکسیدان: از وانیلین به عنوان یک آنتی اکسیدانت بالقوه در بسیاری از مواد غذایی و دارویی به ویژه در مواد غذایی کمپلکس حاوی اسیدهای چرب چند غیراشباعی استفاده می شود. در واقع این ترکیب آلدئیدی با اکسیده شدن خود مانع از اکسیداسیون مواد حساس در برابر اکسیداسیون می شود (۱۹). در صنایع داروسازی و پزشکی از وانیلین به عنوان یک حدواسط در سنتز داروهایی از جمله ال- دوپا، متیل-دوپا، پاپاورین و تری متوپریم استفاده می شود. از کابردهای دیگر وانیلین در صنایع دارویی می توان به سنتز انواع عوامل کف زدا و تولید انواع آفت کشها اشاره نمود (۵۶). از موارد دیگر مصرف وانیلین می توان به استفاده از این ترکیب در صنایع عطرسازی به عنوان یکی از اجزای تشکیل دهنده انواع مختلفی از ادکلنها و همچنین در ترکیب انواع کرمهای

آرایشی اشاره نمود. در حال حاضر عمده وانیلین مصرفی از طریق استخراج فیزیکی از گیاه و عمدتاً سنتز شیمیایی تأمین می شود. در ارتباط با تهیه وانیلین از منابع گیاهی باید گفت که علی رغم اینکه ترکیبات معطر استخراج شده از منابع گیاهی از سوی سازمانهای مسئول نظارت بر فرآورده های بیوتکنولوژی در گروه ترکیبات طبیعی طبقه بندی شده و از مشتریان زیادی در بازارهای جهانی برخوردار می باشد اما با توجه به اینکه از یک سو استخراج این ترکیبات از گیاهان مشکل، پرهزینه و دارای اثرات اکولوژیک منفی بر روی جمعیتهای گیاهی بوده و از سوی دیگر با توجه به پایین بودن غلظت ترکیبات موجود در گیاهان و با در نظر گرفتن این موضوع که منابع گیاهی دستخوش تغییراتی از قبیل تغییرات آب و هوایی، سیل، خشکسالی، تغییرات غیرقابل کنترل در کیفیت محصولات بوده و همچنین با توجه به محدودیت دسترسی به منابع گیاهی موجود، لزوم جستجوی منابع جایگزین الزامی می باشد (۴۰). در ارتباط با تولید وانیلین از طریق سنتز شیمیایی باید اشاره نمود که این فرآیندها از نظر زیست محیطی بسیار زیانبار بوده و دارای هزینه های نسبتاً بالا به سبب دفع پسماندهای سمی می باشد(۶ و ۷). اگرچه نرخ تولید اکثر ترکیبات معطر سنتز شده از طریق سنتز شیمیایی در مقایسه با استخراج از منابع گیاهی پایین تر بوده اما با توجه به قوانین تصویب شده در اروپا و آمریکا از سوی سازمانها و کمیته های کنترل کننده و مسئول نظارت بر این فرآورده ها مبنی بر اینکه؛ ایجاد مواد معطر طبیعی تنها از طریق فرآیندهای فیزیکی به وسیله استخراج مستقیم از منابع گیاهی/حیوانی و یا به واسطه فرآیند های آنزیمی و میکروبی قابل قبول می باشد؛ بنابراین، این طبقه بندی نوعی تضاد و دوگانگی را در بازارهای جهانی ایجاد نموده و باعث شده ترکیباتی که دارای برچسب طبیعی بوده به عنوان ترکیبات سودمند و مفید قلمداد شده در حالی که سایر ترکیبات سنتز شده از طریق روشهای سنتز شیمیایی در گروه ترکیبات غیرطبیعی طبقه بندی شوند که این امر باعث شده ترکیبات اخیر با استقبال کمی از سوی مشتریان در بازارهای جهانی مواجه گردند (۷). اگرچه از نظر شیمیدانها بین ترکیب سنتز شده در طبیعت و ترکیب مشابه سنتز شده در آزمایشگاه تفاوتی وجود ندارد اما قیمت فروش ترکیب معطر طبیعی به دلیل استقبال زیاد از سوی مشتری بسیار بالاتر از ترکیب معطر مشابه تولید شده به وسیله سنتز شیمیایی می باشد. این موضوع خود محرک تحقیقات بیشتر در زمینه توسعه فرآیندهای بیوتکنولوژی نوین برای تولید خوش طعم کننده های غذایی با ارزش به ویژه وانیلین شده است. اگرچه در حال حاضر عمده وانیلین مصرفی از طریق روشهای سنتز شیمیایی تهیه می شود اما با توجه به افزایش روزافزون تقاضا برای مصرف وانیلین طبیعی، رویکردهای بیوتکنولوژی شامل استفاده از کشت سلول یا بافت گیاهی، زیست تبدیلی میکروبی و مهندسی متابولیک به عنوان راهبردهای نوین توسعه داده شده است که در این میان استفاده از زیست تبدیلی میکروبی با استفاده از سوبستراهای فنیل پروپانوئیدی از اهمیت تجاری بالاتری برخوردار است (۱۳و ۳۰). هدف از مقاله مروری اخیر، بررسی جدیدترین مطالعات انجام شده در زمینه تولید زیستی وانیلین طبیعی از سوبستراهای فنیل پروپانوئیدی به وسیله زیست تبدیلی با استفاده از سلولهای میکروبی می باشد. فنیل پروپانوئیدها شامل انواع مختلفی از سوبستراهای فنلی از جمله اوژنول، ایزواوژنول و اسید فرولیک بوده که به عنوان سوبستراهای طبیعی پیش ساز برای سنتز وانیلین طبیعی به کار گرفته شده اند. در حال حاضر بیشترین تحقیقات بر استفاده از این سوبستراها متمرکز شده است.

زیست تبدیلی میکروبی اسید فرولیک به وانیلین : اسید فرولیک (۳-(۴- هیدروکسی-۵- متوکسی فنیل)-۱- پروپینویک اسید) یا کونیفریک اسید با فرمول بسته $C_{10}H_{10}O_4$ از مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید موجود در دیواره های سلولی گیاهی بوده که دارای دو حالت ایزومری سیس و ترانس می باشد. این ترکیب اولین بار در

سال ۱۸۶۶ با استفاده از استخراج الکلی از پوست درخت گیاه دارویی آنغوزه (Ferula foetida) جداسازی شد (۲۳). با توجه به خواص آنتی اکسیدانتی قوی از این ترکیب در انواع صنایع به ویژه در صنایع آرایشی برای ساخت انواع کرمهای ضد آفتاب استفاده می شود. اسید فرولیک در انواع پسماندهای کشاورزی مانند سبوس گندم و برنج، تفاله چغندرقند و نیشکر و تفاله ذرت به فراوانی یافت می شود. میزان اسید فرولیک موجود در منابع گیاهی بسیار متفاوت می باشد. برای مثال در تفاله ذرت غلظت آن حدود ۲ تا ۴ درصد وزن خشک سلولی را تشکیل می دهد در حالی که در سبوس برنج بین ۱/۵ تا ۲ درصد و در تفاله چغندرقند و نیشکر بین ۰/۸ تا ۱/۵ درصد را تشکیل می دهد. با توجه به اینکه اسید فرولیک در دیواره های سلولی گیاهی به صورت کووالانسی و از طریق پیوندهای استری به پلی ساکاریدهای دیواره سلولی به ویژه سلولز، لیگنین و پکتین متصل می باشد، بنابراین برای استخراج آن نیاز به انواع تیمارهای مختلف آنزیمی و غیرآنزیمی می باشد (۴۹). اگرچه استخراج شیمیایی اسید فرولیک از منابع گیاهی بسیار ساده و دارای راندمان بالا می باشد اما با توجه به اینکه اسید فرولیک استخراجی در گروه ترکیبات طبیعی طبقه بندی نمی شود بنابراین باید از روشهای آنزیمی برای استخراج اسید فرولیک طبیعی استفاده نمود. دو منبع مهم و اصلی تأمین کننده سوبسترای اسید فرولیک طبیعی شامل تفاله چغندرقند و سبوس کوبیده ذرت بوده که با توجه به اینکه این مواد جزء فضولات و پسماندهای کشاورزی محسوب می شوند از آنها می توان به عنوان منابع تجدیدشدنی و ارزان قیمت جهت ایجاد فرآورده های با ارزش مانند وانیلین، ۴- وینیل گایاکول و اسید وانیلیک استفاده نمود. سبوس ذرت و تفاله چغندرقند حاوی مقادیر بالایی از اسید فرولیک بوده که به صورت کووالانسی به واحدهای قندی (آرابینوز، گالاکتوز) متصل شده اند. این واحدهای قندی به ترکیبات هتروگزیلانی و پکتین های موجود در دیواره سلولی به صورت کووالانسی اتصال پیدا کرده اند. با استفاده از تکنیک NMR جایگاه دقیق این اتصالات مشخص شده است. در ارتباط با تفاله چغندرقند، ۵۰ درصد اسید فرولیک به اکسیژن شماره ۲ آرابینوز و ۵۰ درصد مابقی به اکسیژن شماره ۶ گالاکتوز لینک شده است. در مورد سبوس کوبیده ذرت بیش از ۸۰ درصد اسید فرولیک به اکسیژن شماره ۵ آرابینوز متصل شده است. میزان تفاله چغندرقند حاصل از صنایع تصفیه قند در اروپا سالیانه بالغ بر ۱۴ میلیون تن و سبوس ذرت حاصل از صنایع غلات حدود ۵ میلیون تن می باشد (۴۹). اگرچه در حال حاضر از این فرآورده های جانبی به عنوان خوراک دام استفاده می شود اما تلاشهای بسیاری با هدف استفاده از آنها جهت تولید ترکیبات با ارزش افزوده بالا شامل سوخت اتانولی و ترکیبات معطر با ارزش به ویژه وانیلین در حال انجام هستند. با هدف دستیابی به اسید فرولیک طبیعی ابتدا با استفاده از انواع تیمارهای فیزیکی مختلف، منبع حاوی اسید فرولیک، به ویژه سبوس کوبیده ذرت و تفاله چغندرقند تحت تیمارهای اسیدی و دمایی قرار گرفته و سپس با استفاده از انواع آنزیمها شامل آنزیمهای تجزیه کننده پلی ساکاریدهای دیواره سلولی (سلولازها، پکتینازها و لیگنین پراکسیدازها) اسید فرولیک به صورت آزاد استخراج می شود. با توجه به شباهت ساختاری بین فرولیک اسید و مشتقات وانیلینی، زیست تبدیلی اسید فرولیک در طیف وسیعی از اورگانیسم ها گزارش شده است. انواع مختلفی از باکتریها، مخمرها، قارچها و تعداد معدودی از جلبکها قابلیت بیوترانسفورماسیون اسید فرولیک را به انواع متوکسی فنل های با ارزش مانند وانیلین، وانیلیک اسید و ۴-وینیل گایاکول (۴-هیدروکسی-۳- متوکسی استیرن) دارا هستند (جدول۱).

گرچه دکربوکسیلاسیون فرولیک اسید در گونه های مختلف میکروبی گزارش شده است با این حال در اکثر سویه های مطالعه شده تولید وانیلین یا وانیلیک اسید از فرولیک اسید بسیار ناچیز گزارش شده است. از میان زیست واکنشگرهای مؤثر در تولید وانیلین از اسید فرولیک

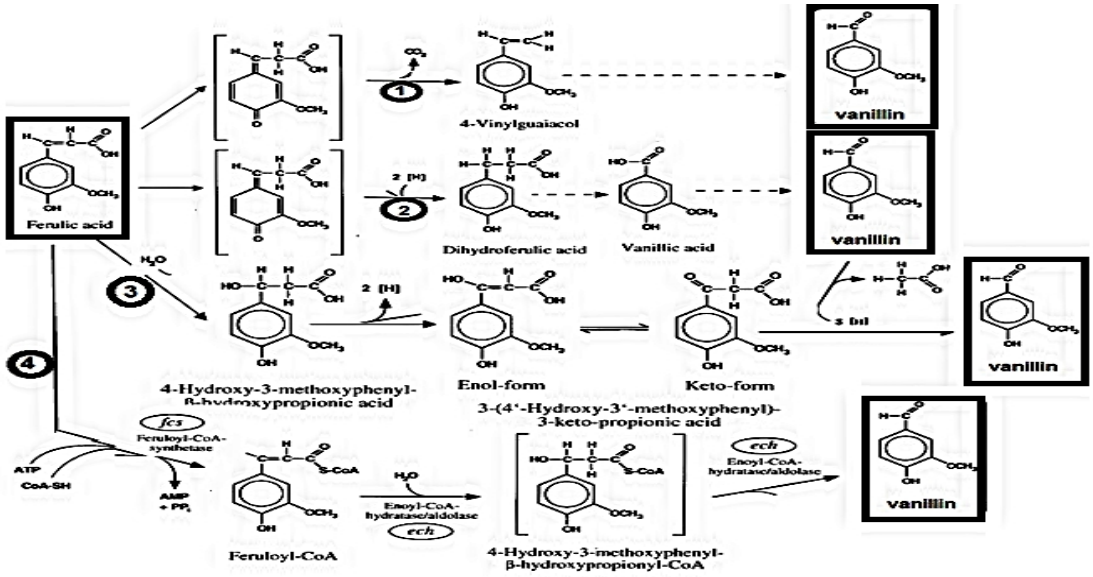
می توان به دو سویه اکتینومیستی *Streptomyces setonii* ATCC 39116 (۴۹) و *Amycolatopsis* sp. HR 167 (۷) اشاره نمود.

جدول ۱- زیست تبدیلی اسید فرولیک به وسیله میکروارگانیسم های مختلف

Microorganism	Substrate	Product	Reference
Halomonas salina HSL5	Ferulic acid	Vanillic acid	(3)
Bacillus licheniformis SHL1	Ferulic acid	Vanillic acid	(15)
Schizophyllum commune	Ferulic acid	4-vinylguaiacol	(70)
Streptomyces sannanensis MTCC 6637	Ferulic acid	Vanillic acid	(28)
Halomonas elongata	Ferulic acid	Vanillic acid	(4)
Streptomyces halstedii	Ferulic acid	Vanillic acid	(18)
Bacillus coagulans	Ferulic acid	4-vinylguaiacol	(37)
Haematococcus pluvialis	Ferulic acid	Vanillin	(72)
Pycnoporus cinnabarinus	Ferulic acid	Vanillin	(53)
Streptomyces setonii ATCC 39116	Ferulic acid	Vanillin	(50)
Amycolatopsis sp. HR 167	Ferulic acid	Vanillin	(60)
Spirulina platensis	Ferulic acid	Vanillin	(62)
Aspergillus niger + Pycnoporus cinnabarinus	Ferulic acid	Vanillin	(43)
Pseudomonas fluorescens	Ferulic acid	Vanillic acid	(8)
Polyporus versicolor	Ferulic acid	Vanillin	(63)
Alcaligenes paradoxus	Ferulic acid	Vanillin	(41)
Pycnoporus cinnabarinus	Ferulic acid	Vanillin	(24)
Rhodotorula rubra	Ferulic acid	Vanillic acid	(32)
Corynebacterium glutamicum	Ferulic acid	Vanillin	(42)
Paecilomyces variotii	Ferulic acid	Vanillin	(61)
Escherichia coli	Ferulic acid	Vanilllin	(54)
Streptomyces setonii	Ferulic acid	Vanillin	(66)
Pseudomonas acidovorans	Ferulic acid	Vanillin	(69)
Fomes fomentaris	Ferulic acid	Vanillin	(34)

این سویه ها قادر به تبدیل اسید فرولیک به وانیلین با راندمان مولی ۷۵ درصد بوده و میزان وانیلین تولیدی بیش از ۱۰ گرم درلیتر گزارش شده که تا به امروز بالاترین راندمان تولید وانیلین از فرولیک اسید می باشد. علی رغم راندمان بالا، با توجه به مشکلات فرآیندهای پایین دستی و بالادستی تخمیر اکتینومیست ها، تولید وانیلین طبیعی به صورت نیمه صنعتی اجرا شده و تا به حال فرآیند مذکور توسعه صنعتی داده نشده است. درباره تولید دیگر متابولیت با ارزش (اسید وانیلیک) از اسید فرولیک، مطالعات وسیعی صورت گرفته که از مؤثرترین آنها می توان مطالعات زیر را برشمرد. در مطالعه صورت گرفته توسط برونتی و همکارانش در سال ۲۰۰۴، با استفاده از *Streptomyces halstedii* سوبسترای اسید فرولیک (غلظت ۱ گرم درلیتر)، تحت شرایط بهینه شده، پس از ۲۴ ساعت واکنش زیست تبدیلی به اسید وانیلیک با راندمان مولی ۸۰ درصد تبدیل شده است (۱۸). در مطالعه صورت گرفته توسط ابدول کافی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ به وسیله *Halomonas elongate*، اسید فرولیک (غلظت ۱۰ میلی مولار)، تحت شرایط بهینه شده، پس از ۱۰ ساعت واکنش زیست تبدیلی به اسید وانیلیک با راندمان مولی ۸۲ درصد تبدیل شده است (۵). نتایج تحقیقات آشنگرف و همکارانش (۱۵) نشان داد که با استفاده از ۱ گرم در لیتر اسید فرولیک (به عنوان سوبسترا)، اسید وانیلیک در غلظت ۴۹۴ میلی گرم در لیتر (با راندمان مولی ۶۰ درصد) تحت شرایط بهینه نشده به وسیله *Bacillus licheniformis* SHL1 تولید شده است. در جدیدترین مطالعه صورت گرفته توسط آشنگرف و همکارانش (۳)، با استفاده از *Halomonas salina* HSL5 سوبسترای اسید فرولیک (غلظت ۱ گرم در لیتر) به اسید وانیلیک (۱/۲۸ گرم در لیتر با راندمان مولی ۱۳/۸ درصد) پس از ۴۸ ساعت واکنش، تحت شرایط بهینه نشده، حاصل

شده است. براساس مطالعات انجام شده چهار مسیر اصلی متابولیسمی برای زیست تبدیلی اسید فرولیک به وانیلین شناسایی شده است (شکل ۱).



شکل ۱- مسیرهای اصلی بیوترانسفورماسیون فرولیک اسید برای تشکیل وانیلین

مسیر اول شامل دکربوکسیلاسیون اسید فرولیک به وسیله یک آنزیم دکربوکسیلازی به ۴- وینیل گایاکول بوده که ترکیب اخیر به وانیلین تبدیل می شود. مکانیسم دقیق تبدیل ۴- وینیل گایاکول به وانیلین تا به امروز مشخص نشده است. اگرچه این مسیر به طورخاص در قارچها و مخمرها مشاهده شده است، با این حال در تعداد معدودی از گونه های باکتری شامل *Bacillus pumilus*، *Lactobacillus plantarum* و *Pseudomonas cepacia* نیز گزارش شده است (۷). مسیر دوم شامل احیای زنجیره جانبی اسید فرولیک به ترکیب ۴- هیدروکسی-۳- متوکسی فنیل پروپیونیک اسید (دی هیدرو فرولیک اسید) بوده که ترکیب اخیر از طریق اسید وانیلیک به وانیلین تبدیل می شود. اگرچه این واکنش به صورت تیپیک در شرایط تجزیه بی هوازی فرولیک اسید رخ می دهد اما گزارشاتی در ارتباط با احیای اسید فرولیک به وانیلین تحت شرایط هوازی در گونه هایی از *Phanerochate chrysosporium* و *Psedomonas fluorescens* نیز وجود دارد (۷). مسیر سوم شامل هیدراسیون باند دوگانه زنجیره جانبی اسید فرولیک بوده که منجر به تشکیل یک حدواسط هیدروکسیلی به نام ۴- هیدروکسی-۳- متوکسی فنیل- بتا- هیدروکسی پروپیونیک اسید می شود. ترکیب اخیر به وسیله یک آنزیم آلدولازی به وانیلین و استات تبدیل می شود. در مسیر چهارم اسید فرولیک در ابتدا با استفاده از آنزیم فرولویل کوآنزیم A سنتتاز در حضور ATP و کوآنزیم A (CoA-SH) تبدیل به مشتق کوآنزیمی فرولویل کوآنزیم A می شود. سپس به وسیله آنزیم انویل کوآنزیم A هیدراتاز/آلدولاز تبدیل به یک حدواسط هیدروکسیلی به نام ۴- هیدروکسی-۳- متوکسی فنیل- بتا- هیدروکسی پروپیونیل کوآنزیم A شده که در نهایت به یک ترکیب کتونی اکسیده می شود. ترکیب کتونی حاصل به وانیلین تبدیل می گردد.

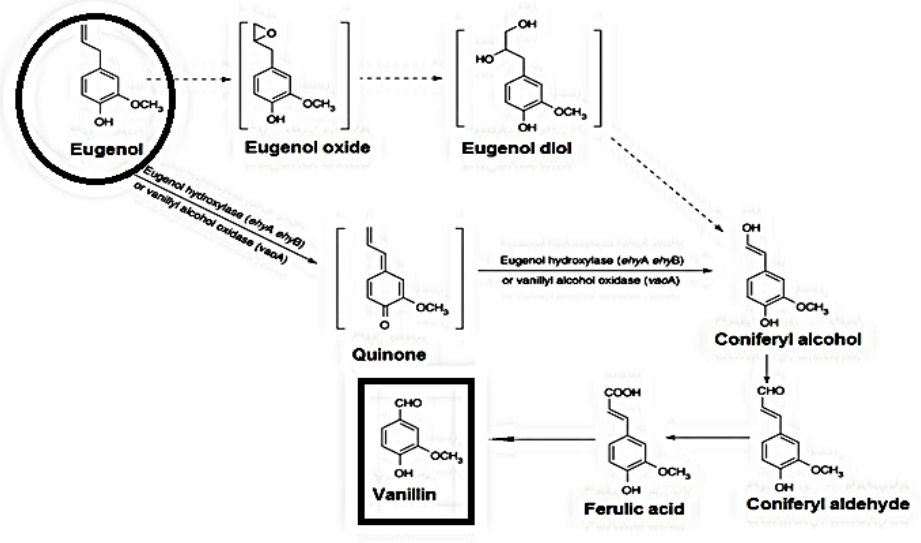
زیست تبدیلی میکروبی اوژنول به وانیلین : اوژنول (۲- متوکسی-۴- (۲- پروپنیل) فنل) با فرمول بسته $C_{10}H_{12}O_2$، از فنیل پروپانوئیدهای لیگنینی بوده که به مقادیر فراوان در

روغن درخت میخک یافت می شود. درخت میخک بومی جزایر اندونزی می باشد. در سال ۲۰۱۰ تولید سالیانه روغن میخک از درخت میخک به بیش از ۸۰۰۰۰ تن رسیده است که با توجه به فراوانی و همچنین قیمت بسیار پایین (قیمت هر کیلوگرم ۵ تا ۹ دلار)، از آن می توان در مقیاس صنعتی برای تولید انواع متوکسی فنلهای با ارزش به ویژه وانیلین و اسید وانیلیک استفاده نمود (۷ و ۱۳). از ترکیبات اصلی تشکیل دهنده روغن میخک می توان به اوژنول (بین ۷۰ تا ۹۰ درصد) ، ایزواوژنول (بین ۵ تا ۱۵ درصد) ، متیل اوژنول و همچنین بتاکاریوفیلین اشاره نمود. با توجه به فرار بودن و همچنین انحلال بسیار پایین در آب، از تقطیر به کمک بخار آب می توان برای جداسازی روغن میخک از درخت میخک استفاده نمود. در واقع با استفاده از تقطیر به کمک بخار آب می توان ترکیبات آلی فراری را که با آب مخلوط نمی شوند و یا تقریباً غیرقابل اختلاط هستند جدا نمود. از اوژنول با توجه به خواص آنتی اکسیدانتی، خواص ضد باکتریایی و همچنین خوشبو بودن در بسیاری از صنایع به ویژه صنایع آرایشی، دارویی و همچنین به طورخاص در دندانپزشکی استفاده می شود. در دندانپزشکی از اوژنول به عنوان ضدعفونی کننده و همچنین برای تسکین درد دندان استفاده می شود. از کاربردهای دیگر اوژنول در دندانپزشکی می توان به ترکیب اوژنول- اکسید روی که ماده ای مرکب از اوژنول و اکسید روی است اشاره نمود. این ترکیب برای پرکردن موقت دندان و یا به صورت پایه سیمانی برای اتصال به پرکردن دندان موقت و همچنین برای محافظت پالپ دندان استفاده می شود (۵۲). زیست تبدیلی اوژنول به طور وسیعی در انواع سویه های باکتری به ویژه از جنس *Pseudomonas* و همچنین در برخی از سویه های قارچی مطالعه شده است (۶). نخستین مطالعه از زیست تبدیلی اوژنول در سویه ای از *Corynebacterium* گزارش شده است. در این سویه اوژنول پس از تبدیل شدن به کونیفریل الکل و کونیفریل آلدئید از طریق فرولیک اسید به وانیلین و وانیلیک اسید تبدیل می شود (۶۷). تشکیل اوژنول- اکساید و اوژنول- دیول به عنوان محصولات اولیه حاصل از تجزیه اوژنول پیشنهاد شده است با این حال مکانیسم دقیق اکسیداسیون زنجیره جانبی اوژنول به کونیفریل الکل هنوز مشخص نشده است (۶۸). درعصاره های میسیلیومی قارچ *Fusarium solani* بیوترانسفورماسیون اوژنول به ۴- وینیل گایاکول و وانیلین از طریق فرولیک اسید گزارش شده است (۵۱). در سویه باکتری *Psedomonas* sp. HR199 مکانیسم دقیق متابولیسم اوژنول شناسایی شده است (۶۰). در این باکتری ابتدا اوژنول به وسیله آنزیم اوژنول هیدروکسیلاز به کونیفریل الکل تبدیل می شود. سپس کونیفریل الکل به وسیله آنزیم کونیفریل الکل دهیدروژناز به کونیفریل آلدئید تبدیل می شود. پس از آن کونیفریل آلدئید حاصل به کمک آنزیم کونیفریل آلدئید دهیدروژناز تبدیل به فرولیک اسید شده که در نهایت به وانیلین تبدیل می شود. از دیگر مسیرهای متابولیسمی شناخته شده در ارتباط با تجزیه اوژنول می توان به مسیر کاتابولیکی اوژنول در یک سویه قارچی از *Penicillium simplicissimum* اشاره نمود (۲۲). در این قارچ ابتدا اوژنول به وسیله آنزیم وانیلیل الکل اکسیداز و از طریق تشکیل یک حدواسط کوئینونی تبدیل به کونیفریل الکل شده که در نهایت مشابه با مسیرمتابولیسمی *Psedomonas* sp. HR199 تبدیل به وانیلین می شود. در شکل (۲) مسیرهای متابولیسمی شناخته شده اوژنول به وانیلین نشان داده شده است.

آنچه مسلم است این است که در بیشتر فرآیندهای مطالعه شده در ارتباط با زیست تبدیلی اوژنول، غلظت وانیلین به عنوان یک متابولیت اصلی بسیار ناچیز بوده و متابولیتهای اصلی فرولیک اسید، کونیفریل الکل یا وانیلیک اسید بوده است (جدول۲).

با وجود اینکه طیف متنوعی از میکرواورگانیسم ها شامل انواع سویه های باکتری و قارچی از جمله

Corynebacterium، سویه های مختلفی از *Pseudomonas*، *Rhodococcus*، *Byssochlamyces*، *Fusarium*، *Amycolatopsis* و *Pencillium* جهت مطالعات زیست تبدیلی اوژنول به متوکسی فنلهای با ارزش توسط محققان بسیاری مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند با این حال، در تمامی فرآیند های مطالعه شده مقادیر بسیار کمی وانیلین به عنوان متابولیت اصلی در مخلوط واکنش زیست تبدیلی تشکیل شده است (۶).



شکل ۲- مسیرهای متابولیسمی شناخته شده اوژنول برای ایجاد وانیلین طبیعی

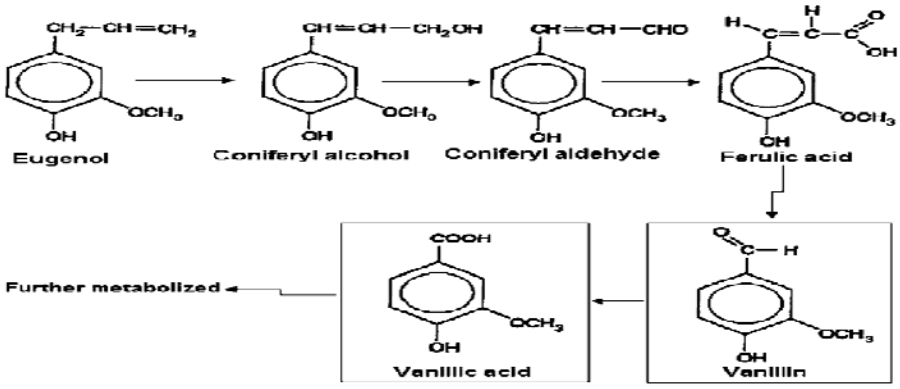
جدول ۲- میکروارگانیسم های با قابلیت زیست تبدیلی اوژنول به وانیلین و دیگر متوکسی فنلهای با ارزش

Substrate	Microorganism	Vanillin yield (g/l)	Reference
Eugenol	*Pseudomonas resinovorans* SPR1	0.24 g/l	(12)
Eugenol	*Pseudomonas nitroreducens*	Trace amount•	(71)
Eugenol	*Rhodococcus opacus* PD630	Trace amount	(59)
Eugenol	*Amycolatopsis* sp. HR167	Trace amount	(57)
Eugenol	*Pseudomonas* sp. HR199	0.3	(56)
Eugenol	*Pseudomonas putida*	Trace amount	(49)
Eugenol	*Pseudomonas* spp	Trace amount	(26)
Eugenol	*Pseudomonas* sp. TK2102	0.28	(73)
Eugenol	*Penicillium simplicissimm*	Trace amount	(22)
Eugenol	*Serratia* spp	Trace amount	(59)
Eugenol	*Fusarium solani*	Trace amount	(51)
Eugenol	*Coynebacterium gltamicum*	Trace amount	(68)

• Trace amount: وانیلین تشکیل شده در مقادیر بسیار ناچیز بوده و متابولیتهای اصلی حاصل از متابولیسم اوژنول شامل فرولیک اسید، وانیلیک اسید و یا کونیفریل الکل بوده است.

نخستین زیست تبدیلی اوژنول به متوکسی فنلهای مربوطه در سال ۱۹۷۷ توسط تاداسا در سویه خاصی از *Corynebacterium* sp. گزارش شده است (۶۷). این باکتری قابلیت تجزیه اوژنول را از طریق مسیر اسید فرولیک دارا بوده و متابولیتهای اصلی حاصل از تجزیه اوژنول، وانیلین، وانیلیک اسید و پروتئوکاچوئیک اسید تشخیص داده شدند. با توجه به تجزیه متابولیتهای تشکیل شده در سویه مذکور از طریق مسیر تجزیه ای اورتو،

مقادیر بسیار ناچیزی از وانیلین و وانیلیک اسید در مخلوط واکنش زیست تبدیلی تشکیل شده است. در مطالعه دیگری توسط ماوین کورف و نازارت در سال ۱۹۸۶ اسید فرولیک اسید به عنوان حدواسط اصلی در مسیر تجزیه اوژنول در سویه قارچی *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. تشخیص داده شد (۵۱). با این وجود تجمعی از وانیلین یا وانیلیک اسید در پروسه مذکور مشاهده نشده است. براساس گزارش مارکوس و همکارانش در سال ۱۹۹۲ در یک فرآیند آنزیمی با کمک آنزیم لیپواکسیژناز اوژنول به وانیلین تبدیل شده است. با این وجود غلظت وانیلین تولید شده تنها ۳۰ تا ۵۰ میلی گرم در لیتر گزارش شده است (۴۷). واشیسو و همکارانش (۱۹۹۳) با استفاده از سویه *Pseudomonas* sp. TK2012 موفق به تولید ۲۸۰ میلی گرم در لیتر وانیلین شدند. سایر متابولیتهای اصلی تشکیل شده شامل کونیفریل الکل، کونیفریل آلدئید، فرولیک اسید و وانیلیل الکل بوده است (۷۳). رابن هورست در سال ۱۹۹۶ سویه ای از *Pseudomonas* sp. را جدا سازی نمودند که قابلیت تولید کونیفریل الکل و کونیفریل آلدئید را در مقادیر کم و اسید فرولیک را در مقادیر بالا دارا بود. با این وجود تشکیل وانیلین به عنوان حدواسط اصلی مشاهده نشده است (۲۶). در مطالعه دیگری موهیم و لرچ (۱۹۹۹) سویه ای از *Psudomonas putida* با قابلیت تحمل پذیری بالا نسبت به اوژنول جداسازی نمودند که به طور مؤثری اسید فرولیک را به اسید وانیلیک تبدیل می نمود. در فرآیند مذکور تجمعی از وانیلین مشاهده نشده است (۴۹). فرکاوا در سال ۱۹۹۹ با توسعه یک فرآیند فیدبچ موفق به تبدیل اوژنول به کونیفریل الکل با راندمان مولی ۹۴/۶ درصد تحت شرایط سلولهای در حال استراحت *Byssochlamys flava* V107 شده است. در این فرآیند نیز تجمعی از وانیلین یا اسید وانیلیک مشاهده نشده است (۲۶). آورهیج و همکارانش در سال ۲۰۰۳ با بررسی سویه تجزیه کننده اوژنول *Pseudomonas* sp. HR199 موفق به تولید ۰/۳ گرم درلیتر وانیلین با راندمان مولی ۸۹/۳ درصد شدند که تا به امروز بالاترین گزارش منتشرشده از تولید وانیلین از اوژنول محسوب می شود (۵۶). در جدیدترین مطالعات صورت گرفته توسط آشنگرف و همکارانش (۲۰۱۱)، با استفاده از سویه غربالگری شده *Pseudomonas resinovorans* SPR1 سوبسترای اوژنول را با راندمان مولی ۱۰ درصد به وانیلین و ۴۴ درصد به اسید وانیلیک تبدیل نموده و ماکزیمم غلظت وانیلین و اسید وانیلیک تولیدی در فرآیند مذکور ۱۰ و ۴۴ درصد به ترتیب پس از ۳۰ و ۶۰ ساعت انکوباسیون بود (۱۲). در این مطالعه همچنین متابولیتهای اصلی حاصل از کاتابولیسم اوژنول در سویه غربالگری شده SPR1 با استفاده از آنالیزهای همزمان TLC و HPLC، GC-Mass تشخیص داده شده و مسیر متابولیسمی احتمالی اوژنول ترسیم شده است (شکل ۳).



شکل ۳- مسیر متابولیسمی زیست تبدیلی اوژنول به وسیله *P. resinovorans* SPR1 (۱۲).

زیست تبدیلی میکروبی ایزواوژنول به وانیلین: ایزواوژنول (۴- هیدروکسی-۳- متوکسی-۱- پروپنیل بنزن) با فرمول بسته $C_{10}H_{12}O_2$ یک ترکیب فنیل پروپانوئیدی است که می توان 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. علی رغم روشهای شیمیایی متعدد برای ایزومریزاسیون اوژنول به ایزواوژنول، با توجه به اینکه ایزواوژنول حاصل در گروه ترکیبات طبیعی طبقه بندی نمی شود بنابراین برای دستیابی به ایزواوژنول طبیعی باید از آنزیمهای ایزومرازی که به صورت تجاری در بازار موجود هستند استفاده نمود. اگرچه از لحاظ قیمتی ایزواوژنول طبیعی در مقایسه با اوژنول گران تر است اما در مقایسه با فرولیک اسید طبیعی بسیار مقرون به صرفه تر بوده و بنابراین در سالهای اخیر، بیشتر مطالعات براستفاده از ایزواوژنول به عنوان یک سوبسترای پیش ساز مناسب برای تولید وانیلین طبیعی متمرکز شده است (۷۴). طیف وسیعی از میکرواورگانیسم های مختلف با قابلیت بیوترانسفورماسیون ایزواوژنول به وانیلین جداسازی شده اند. در جدول (۳) لیستی از بیوکانورژن های مؤثر ایزواوژنول به وانیلین نشان داده شده است.

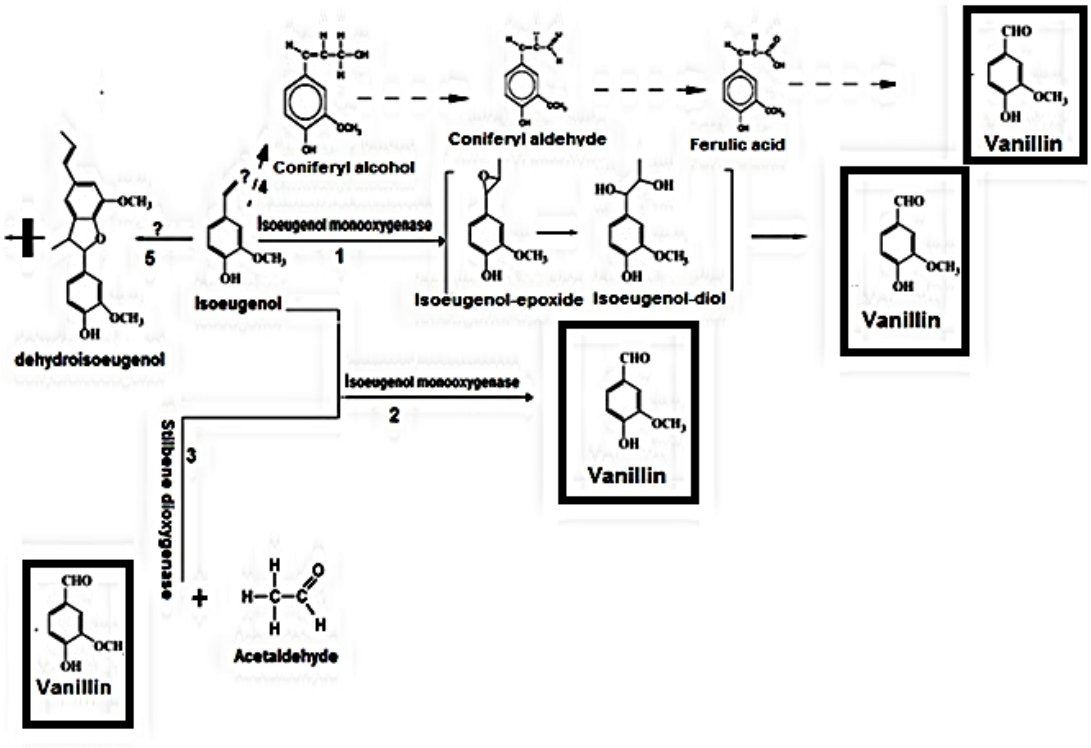
جدول ۳- زیست تبدیلی ایزواوژنول به وانیلین به وسیله میکروارگانیسم های مختلف

Microorganism	Substrate	Vanillin yield (g/L)	Molar yield (%)	Reference
Candida galli Strain PGO6	Isoeugenol	0.123	48	(11)
Pseudomonas aeruginosa	Isoeugenol	1.62	17.3	(13)
Pseudomonas sp. strain KOA1	Isoeugenol	0.88	9.5	(1)
Pseudomonas sp. isolate ISPC2	Isoeugenol	1.15	10.2	(9)
Psychrobacter sp. strain CSW4	Isoeugenol	0.088	16.4	(14)
Pseudomonas putida	Isoeugenol	16.1	71	(75)
Pseudomonas cholororaphis	Isoeugenol	1.2	12.9	(38)
Bacillus subtilis HS8	Isoeugenol	1.36	14.7	(76)
Bacillus fusiformis	Isoeugenol	32.5	5.8	(77)
Bacillus subtilis B2	Isoeugenol	0.61	12.4	(65)
Rhodococcus rhodochrous	Isoeugenol	1	58	(20)
Serratia marcescence	Isoeugenol	3.8	20.5	(59)
Aspergillus niger	Isoeugenol	0.08	10	(6)

همانگونه که در جدول (۳) مشاهده می شود راندمان تولید وانیلین از ایزواوژنول در مقایسه با اوژنول بسیار بالاتر بوده که حکایت از مناسب بودن این سوبسترا به عنوان پیش ساز برای مطالعات زیست تبدیلی دارد. در سالهای اخیر تحقیقات وسیعی در ارتباط با زیست تبدیلی ایزواوژنول به وانیلین صورت پذیرفته است. با توجه به اینکه راندمان تولید وانیلین در بیشتر فرآیند های مطالعه شده در اثر اکسیداسیون وانیلین به اسید وانیلیک و یا احیای آن به وانیلیل الکل پایین گزارش شده است (۵۵)، بنابراین در بیشتر تحقیقات صورت گرفته از استراتژیهای مختلف از جمله بهینه سازی شرایط واکنش زیست تبدیلی، استفاده از سلولهای در حال استراحت، استفاده از عصاره های 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 منتشر شده، غلظت و راندمان مولی وانیلین ایجاد شده از ایزواوژنول به وسیله سویه *Aspergillus niger* ATCC9142 به ترتیب ۰/۰۸ گرم درلیتر و۱۰ درصد بوده است (۶). رابن هورست و هوپ درسال ۱۹۹۱ 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 گرماگذاری

افزایش یافته است (۵۹). چاترجی و همکارانش در سال ۱۹۹۹ با استفاده از سویه ای از *Rhodococcus rhodochrous* سوبسترای ایزواوژنول را با راندمان مولی ۵۸ درصد به وانیلین تبدیل نموده و بیشترین غلظت وانیلین تولید شده در فرآیند اخیر ۱ گرم درلیتر گزارش شده است (۲۰). در مطالعه دیگری به وسیله سویه *Bacillus sbtilis* B2 غلظت وانیلین تولیدی تحت سلولهای رویشی ۰/۶۱ گرم در لیتر با راندمان مولی ۱۲/۴ درصد بوده که پس از استفاده از عصاره عاری از سلول این میزان به ۰/۹ گرم در لیتر افزایش یافته است (۶۵). زانگ و همکارانش (۲۰۰۶) با استفاده از سویه غربالگری شده *Bacillus subtilis* HS8 سوبسترای ایزواوژنول را با راندمان مولی ۱۴/۷ درصد به وانیلین پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری تبدیل نمود (۷۶). با استفاده از ۶۰ درصد حجمی/حجمی ایزواوژنول (هم به عنوان سوبسترا و هم به عنوان حلال) وانیلین در غلظت ۳۲/۵ گرم درلیتر به وسیله سویه *Bacillus fusiformis* SW-B9 تولید شده است. راندمان مولی این فرآیند تنها ۵/۸ درصد بود (۷۷). زآاو و همکارانش (۲۰۰۶) گزارشی از سویه *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 با قابلیت زیست تبدیلی ایزواوژنول به وانیلین منتشرکردند. میزان تولید وانیلین در سویه مذکور در حالت طبیعی بسیارناچیز بود. پس از اضافه نمودن ۱۲/۵ گرم درلیتر رزین اختصاصی HD-8، غلظت وانیلین به ۸/۱ گرم درلیتر از ۵۰ گرم درلیتر ایزواوژنول و پس از ۷۲ ساعت واکنش زیست تبدیلی رسید. راندمان مولی این فرآیند ۱۷/۴ درصد بوده است (۷۸). در مطالعه انجام شده دیگری توسط کاسانا و همکارانش (۲۰۰۷) غلظت و راندمان مولی وانیلین تهیه شده از ایزواوژنول در سویه *Pseudomonas chlororaphis* CDAE5 به ترتیب ۱/۲ گرم درلیتر و ۱۲/۶ درصد بود (۳۸). در مطالعه دیگری هووا و همکارانش (۲۰۰۷) به وسیله سلولهای رویشی سویه *Bacillus pumilus* S1 تحت شرایط بهینه شده، ۳/۷۵ گرم درلیتر وانیلین با راندمان مولی ۴۰/۵ درصد پس از ۱۵۰ ساعت گرماگذاری به دست آوردند (۳۳). در سال ۲۰۰۷، یامادا و همکارانش به وسیله استراتژی سلولهای درحال استراحت *Pseudomonas putida* IE27 تحت شرایط بهینه شده 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 زیست تبدیلی شدند (۷۵). تا به امروز بالاترین راندمان وانیلین تولیدی از ایزواوژنول مربوط به همین مطالعه می باشد. اگرچه مطالعات مشابه دیگری در ارتباط با زیست تبدیلی ایزواوژنول در سویه هایی از *Pseudomonas nitroreducens* Jin1 (۷۱) و *Arthrobacter* sp. TA13 (۶۵) صورت پذیرفته است، با این حال میزان وانیلین تولید شده از ایزواوژنول در سویه های مذکور بسیار پایین گزارش شده است. آشنگرف و همکارانش در سال ۲۰۰۸ گزارش نمودند که باکتری *Pseudomonas* sp. strain ISPC2 بعد از ۹۶ ساعت واکنش زیست تبدیلی، قادر به تولید ۱/۱۵ گرم در لیتر وانیلین از سوبسترای ایزواوژنول با راندمان مولی ۱۲/۴ درصد می باشد (۹). نتایج تحقیقات آشنگرف و همکارانش در سال ۱۳۸۹ نیز نشان داد که بیشترین غلظت وانیلین تولید شده (۸۸۰ میلی گرم درلیتر) توسط سویه *Pseudomonas* sp. KOA1 در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد 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 بوده است (۱). در سال ۲۰۱۰، آشنگرف و همکارانش، به وسیله سلولهای رویشی *Pseudomonas* sp. KOB10 تحت شرایط بهینه شده با استفاده از روشهای تک فاکتوری و تاگوچی موفق به دستیابی به ۳/۱۴ گرم در لیتر وانیلین از سوبسترای ایزواوژنول با راندمان مولی ۲۲/۵ درصد پس از ۸۸ ساعت واکنش زیست تبدیلی شدند (۱۰). در مطالعه صورت گرفته دیگری در سال ۲۰۱۱، آشنگرف و همکارانش برای اولین بار پتانسیل سویه های مخمری با قابلیت زیست تبدیلی ایزواوژنول به وانیلین و وانیلیک اسید را بررسی

نمودند. نتایج نشان داد که بیشترین میزان وانیلین تولیدی (۱/۱۲ گرم درلیتر) با راندمان مولی ۲۵/۷ درصد پس از ۶۰ ساعت واکنش زیست تبدیلی تحت سلولهای در حال استراحت سویه مخمری *Candida galli* PGO6 ایجاد شده است (۱۱). در تحقیق دیگری نیز، توسط آشنگرف و همکارانش (۲۰۱۲)، برای اولین بار پتانسیل سویه های نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک با قابلیت تبدیل زیستی ایزواوژنول به وانیلین بررسی شد. نتایج نشان داد که با استفاده از ۱۰ گرم در لیتر ایزواوژنول (به عنوان سوبسترا)، وانیلین در غلظت ۱/۲۸ گرم در لیتر تحت شرایط سلولهای در حال استراحت به وسیله *Psychrobacter* sp. CSW4 تولید شده است (۱۴). در جدیدترین مطالعات صورت گرفته توسط آشنگرف و همکارانش در سال ۱۳۹۱ (۲) و ۲۰۱۳ (۱۶) از روشهای بهینه سازی تاگوچی و باکس- بنکن سطح پاسخ به طور موفقیت آمیزی در بهینه سازی تولید وانیلین از ایزواوژنول در سویه نمک دوست *Psychrobacter* sp. strain CSW4 استفاده شد. براساس نتایج به دست آمده با استفاده از روشهای تاگوچی و سطح پاسخ، وانیلین در راندمان های مولی ۳۶/۳ و ۴۳/۸ درصد پس از ۲۴ ساعت واکنشهای زیست تبدیلی ایجاد گردید. زیست تبدیلی ایزواوژنول به وانیلین با استفاده از زیست واکنشگرهای آنزیمی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. از آنزیمهای لیپواکسیژناز (Sigma L8383) (۴۷) و عصاره های آنزیمی استخراج شده از کنجاله سویا (۴۴) نیز برای زیست تبدیلی ایزواوژنول به وانیلین استفاده شده است. با این حال در هردوی این فرآیند ها راندمان وانیلین تولید شده بین ۱۰ تا ۱۵ درصد گزارش شده است. در ارتباط با مسیرهای متابولیسمی ایزواوژنول باید متذکر شد که گرچه در مقایسه با اوژنول و اسید فرولیک مطالعات بسیار کمی صورت گرفته اما با این حال مسیرهای متابولیسمی آن در برخی سویه های خاص به طور اختصاصی مطالعه شده و در نهایت ۵ مسیر متابولیسمی احتمالی برای تبدیل ایزواوژنول به وانیلین پیشنهاد شده است (شکل ۴).



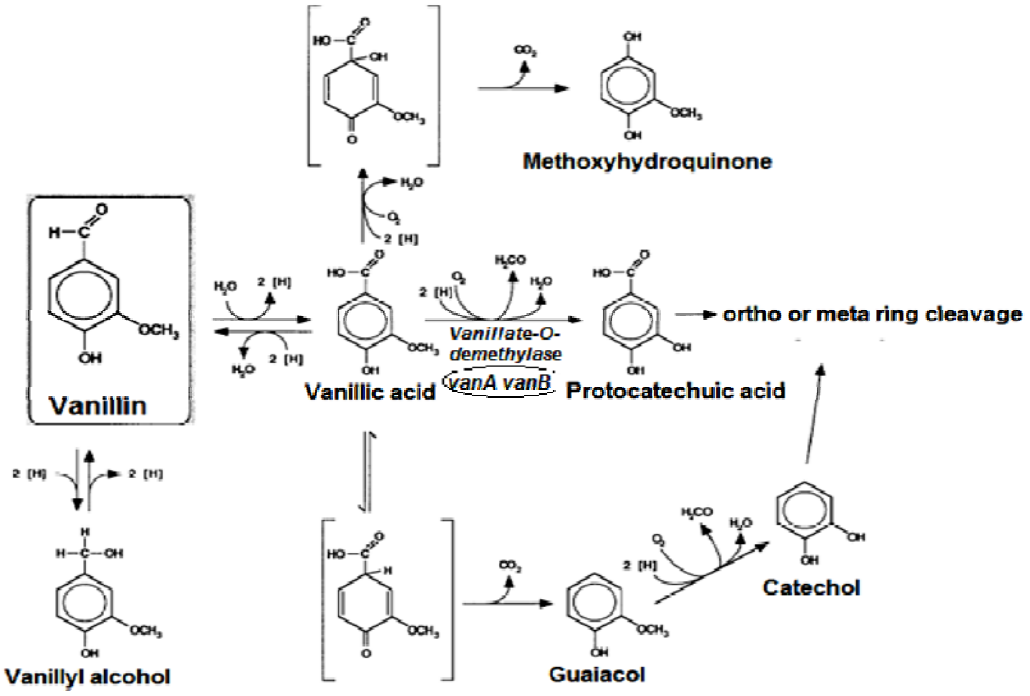
شکل ۴- مسیرهای متابولیسمی پیشنهادی برای تبدیل زیستی ایزواوژنول به وانیلین با استفاده از سلولهای میکروبی

در مسیر اول، اکسیداسیون زنجیره جانبی باند دوگانه ایزواوژنول به وسیله آنزیم القایی مونواکسیژناز، ایجاد حدواسط های اپوکسیدی و دیولی نموده که در نهایت پس از هیدرولیز شدن تبدیل به وانیلین می شوند (این مسیر به طور خاص در سویه باکتری *Pseudomonas nitroreducens* Jin1 شناسایی شده و ژن مربوط به آنزیم ایزواوژنول مونواکسیژناز کلون و بیان شده است) (۶۴). در مسیر متابولیسمی دوم، اکسیداسیون زنجیره جانبی باند دوگانه ایزواوژنول به وسیله آنزیم القایی مونواکسیژناز، مستقیماً ایجاد وانیلین از ایزواوژنول می نماید (این مسیر به طورخاص در سویه باکتری *Pseudomonas putida* IE27 شناسایی شده و ژن مربوط به آنزیم مونواکسیژناز کلون و بیان شده است) (۷۵). در مسیر سوم، ایزواوژنول به وسیله یک آنزیم به نام استیلبن دی اکسیژناز تبدیل به وانیلین و استالدئید می شود (این مسیر به طور خاص در سویه باکتری *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009 شناسایی شده و ژن مربوطه کلون و بیان شده است) (۳۶). در مسیر چهارم، هیدروکسیلاسیون گروه متیل انتهایی ایزواوژنول، ایجاد کونیفریل الکل نموده که در نهایت مشابه با مسیر اوژنول تبدیل به وانیلین می شود (این مسیر به عنوان یک مسیر احتمالی براساس تشخیص متابولیت های مذکور در مخلوط واکنش زیست تبدیلی پیشنهاد شده و تا به حال تایید نشده است (۵۸). و در نهایت در مسیر متابولیسمی پنجم، پلیمریزاسیون ایزواوژنول منجر به ایجاد محصولی به نام دی هیدروایزواوژنول نموده که محصول فوق یک محصول مرده قلمداد شده و قابلیت تبدیل شدن به وانیلین را ندارد. مکانیسم پلیمریزه شدن ایزواوژنول برای ایجاد دی هیدروایزواوژنول تا به امروز مشخص نشده است (۶۴).

نتیجه گیری و پیشنهادات

گرایش جوامع بشری برای مصرف فرآورده های طبیعی در سالهای اخیر موجب ترغیب محققین در استفاده از بیوکاتالیزورهای میکروبی برای سنتز محصولات طبیعی گردیده است. در حال حاضر، روشهای سنتز شیمیایی بیشتر صنایع تولید کننده ترکیبات طبیعی از جمله وانیلین و دیگر متوکسی فنلهای با ارزش را به طرز 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 کاتالیزورهای شیمیایی، براساس قوانین تصویبی در اروپا و آمریکا از سوی سازمانهای مسئول نظارت بر فرآورده های بیوتکنولوژی به ویژه فرآورده های دارویی و غذایی، در بسیاری از صنایع دارویی و غذایی محدود و حتی در مواردی هم ممنوع گردیده است (۳۹و ۵۸). با توجه به روند روبه رشد تقاضای مصرف جهانی برای تولید ترکیبات معطر طبیعی به دلیل اطمینان از کیفیت مطلوب و سالم بودن آنها و همچنین افزایش رو به رشد تقاضای جهانی، لزوم جستجوی منابع جایگزین برای تولید وانیلین طبیعی الزامی می باشد (۲۱، ۳۰ و ۴۶). درحال حاضر مهم ترین فرآیند بیوتکنولوژی برای تهیه وانیلین طبیعی و سایر متوکسی فنلهای با ارزش (به ویژه اسید وانیلیک) زیست تبدیلی میکروبی است (۳۰، ۳۹و ۵۸). فرآیند زیست تبدیلی میکروبی اولاً فرآیندی همسو و متناسب با محیط زیست بوده (شیمی سبز(Green chemistry)) و ثانیاً ترکیبات معطر تولیدی به وسیله فرآیند زیست تبدیلی میکروبی جزء ترکیبات معطر طبیعی طبقه بندی می شوند و بنابراین در بازارهای جهانی با استقبال بالایی از سوی مصرف کنندگان مواجه می شوند (۷۴). به طور کلی تولید ترکیبات طبیعی با استفاده از فرآیندهای بیوتکنولوژی می تواند امکان تولید بیشتر محصول، تولید طعم های 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. در دو دهه اخیر تلاشهای بسیاری برای تولید وانیلین طبیعی از پیش سازهای فنلی ارزان قیمت از جمله اسید فرولیک،

ایزواوژنول و اوژنول صورت پذیرفته که منجر به شناسایی میکروارگانیسم های مختلف تولید کننده وانیلین شده است اما با این حال تا به امروز به مرحله صنعتی نرسیده است. مشکل اصلی در تولید میکروبی وانیلین، اکسیداسیون بالای وانیلین به اسید وانیلیک و یا احیای آن به وانیلیل الکل می باشد. هر دوی این واکنشهای جانبی منجر به کاهش چشمگیری در غلظت وانیلین تولیدی می شوند (۵۸و ۷۴). در بیشتر میکروارگانیسم های مطالعه شده تا به امروز، وانیلین تولید شده دستخوش اکسیداسیون قرار گرفته و تبدیل به وانیلیک اسید شده که ترکیب اخیر یا دی متیله شده و تبدیل به پروتئوکاچوئیک اسید می شود و یا اینکه دکربوکسیله شده و تبدیل به گایاکول می شود. دی متیلاسیون گایاکول ایجاد کاتکول نموده که مشابه با پروتئوکاچوئیک اسید به عنوان یک سوبسترای معمول در مسیرهای شکست اورتو یا متا قرار می گیرد (۱۳و ۵۸). از آنجایی که وانیلین یک ترکیب آلدئیدی است، بنابراین دارای واکنش پذیری بالا با ترکیبات سلولی میکروارگانیسم ها به ویژه با گروههای تیولی آنزیمی بوده که همین امر منجر به سمیت بسیار بالای وانیلین برای بیشتر میکروارگانیسم ها شده است، بنابراین در بیشتر میکروارگانیسم ها به منظور کاهش سمیت وانیلین، واکنشهای زیست تبدیلی وانیلین رخ می دهد (شکل ۵).



شکل ۵- مسیرهای متابولیسمی پیشنهادی در ارتباط با زیست تبدیلی وانیلین (۵۸).

مطالعات زیادی در ارتباط با تشکیل اسید وانیلیک از وانیلین وجود دارد. برای مثال نرخ بالای تجزیه وانیلین در سویه باکتری *Pseudomonas putida* I58 دلیل اصلی بر عدم تشکیل وانیلین از فرولیک اسید بوده است. در این سویه راندمان تولید وانیلیک اسید از فرولیک اسید بیش از ۹۸ درصد گزارش شده است (۲۷). در سویه هایی از *Bacillus subtilis* و *Streptomyces setonii* نیز نرخ تجزیه وانیلین به وانیلیک اسید بسیار بالا بوده و پیشنهاد شده که اکسیداسیون از طریق یک آنزیم به نام وانیلین اکسیداز صورت پذیرفته است (۲۹). جامع ترین مطالعه در ارتباط با مکانیسم زیست تبدیلی وانیلین به وانیلیک اسید در سویه باکتری *Pseudomonas* sp. HR199 گزارش شده است

(۷). براساس مطالعه انجام شده سری کامل ژنهای مسئول زیست تبدیلی وانیلین تا شکسته شدن در مسیر اورتو تشخیص داده شده اند. بنابراین با توجه به نرخ بالای بیوکانورژن وانیلین، لزوم استفاده از استراتژیهای مختلف جهت کاهش یا مهار زیست تبدیلی الزامی می باشد. استراتژیهای پیشنهادی به شرح زیر می باشد: ۱) استفاده از تکنیکهای ایموبیلیزاسیون جهت ایموبیلیزه کردن سوبستراهای اوژنول و ایزواوژنول با هدف دسترسی تدریجی میکروارگانیسم به سوبسترا، کاهش سمیت آن و در نتیجه افزایش راندمان غلظت وانیلین تولیدی در مخلوط واکنش زیست تبدیلی. ۲) استفاده از عوامل جهش زای فیزیکی و شیمیایی با هدف ایجاد سویه های تحمل پذیر با پتانسیل تجزیه کنندگی کمتر وانیلین تولید شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی. ۳) طراحی سیستمهای دوفازی مناسب با هدف بازیافت مداوم محصول و جلوگیری از تجزیه شدن بیشتر آن. ۴) بررسی و مطالعه رزینهای اختصاصی جاذب وانیلین و انتخاب رزینهای مناسب به منظور افزایش راندمان وانیلین تولیدی در واکنش زیست تبدیلی. ۵) بررسی و مطالعه واکنشهای زیست تبدیلی پروپنیل بنزنها تحت کشت مخلوط سویه های بومی غربالگری شده. ۶) مطالعه زیست تبدیلی پروپنیل بنزنها با استفاده از پروسه های فیدبچ. ۷) بررسی و مطالعه دقیق تر مسیرهای متابولیسمی سوبستراهای پروپنیل بنزنی مطالعه شده در سویه های بومی جدا شده با هدف تشخیص ژنهای تولید کننده وانیلین و بررسی امکان استفاده از مهندسی متابولیک به عنوان یک استراتژی مناسب جهت ایجاد سویه های نوترکیب کارآمد و ۸) استفاده از عوامل آنتی اکسیدانتی جهت بازدارندگی آنزیمهای دهیدروژنازی احتمالی دخالت کننده در واکنشهای زیست تبدیلی وانیلین.

منابع

۱. آشنگرف م، نحوی ا، زرکش اصفهانی ح. تهیه وانیلین طبیعی از ایزواوژنول به وسیله یک فرایند زیست تبدیلی میکروبی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. ۱۳۸۹. سال ۵، شماره ۱. صفحه ۹-۱۶.

۲. آشنگرف م، نحوی ا، امینی ج. بهینه سازی تولید تولید بیووانیلین از سلولهای در حال استراحت سویه بومی *Psychrobacter* sp. CSW4 به روش آماری تاگوچی. مجله زیست شناسی کاربردی. ۱۳۹۱. سال ۲۵، شماره ۱. صفحه ۱-۱۶.

۳. آشنگرف م، نحوی ا. استفاده از سلولهای در حال استراحت *Halomonas salina* HSL5 به عنوان زیست واکنشگر برای تولید بیولوژیک اسید وانیلیک. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۱۳۹۳. جلد ۲۷، شماره ۱.

4. Abdelkafi, S., Sayadi, S., Gam, Z.B.A., Casalot, L and Labat, M. 2006. Bioconversion of ferulic acid to vanillic acid by *Halomonas elongate* isolated from table-olive fermentation. FEMS Microbiology Letters 262: 115–120.

5. 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 elongata* DSM 2581T resting cells. World Journal Microbiology and Biotechnology 24: 675–680.

6. Abraham WR, Arfmann HA, Stumpf S, Washausen P, Kieslich K. 1988. Microbial transformations of some terpenoids and natural compounds. In: Schreier P, editor. Biofl avour 87, Analysis, biochemistry, biotechnology. Proceedings of an International Conference. Berlin: de Gruyter. pp. 399 – 414.

7. Achterholt, S., Priefert, H and Steinbüchel, A .2000. Identification of Amycolatopsis sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. Applied Microbiology and Biotechnology 54: 799–807.

8. Andreoni, A., Bernasconi, S and Besetti, G. 1995. Biotransformation of ferulic acid and related compounds by mutant strains of *Pseudomonas fluorescens*. Applied Microbiology and Biotechnology 42: 830-835.

9. Ashengroph, M., Nahvi, I and Zarkesh-Esfahani, H .2008.A bioconversion process using a novel isolated strain of Pseudomonas sp. ISPC2 to produce natural vanillin from isoeugenol. Research in Pharmaceutical Sciences (RPS) 3 (2): 105-111.

10. Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H and Momenbeik, F. 2010.Optimization of media

composition for improving conversion of isoeugenol into vanillin with *Pseudomona*s sp. strain KOB10 using the Taguchi method. Biocatalysis and Biotransformation 28 (5-6): 339-347.

11. 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 (3): 990-998.

12. Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H and Momenbeik, F. 2011. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid. New Biotechnology 28 (6): 656-664.

13. 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.

14. 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): 1-12.

15. Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H and Momenbeik, F. 2012. Novel strain of *Bacillus licheniformis* SHL1 with potential converting ferulic acid into vanillic acid. Annals of microbiology 62 (2): 553-558.

16. Ashengroph, M., Nahvi, I and Amini, J. 2013. Application of Taguchi Design and Response Surface Methodology for Improving Conversion of Isoeugenol into Vanillin by Resting Cells of *Psychrobacter* sp. CSW4. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 12(3): 411-421.

17. Bonnin, E., Brunel, M., Gouy, Y., Lesage-Messen, L., Asther, M and Thibault, J.F. 2001. *Aspergillus niger* I-1472 and *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533, selected for the biotransformation of ferulic acid to vanillin, are also able to produce cell wall polysaccharide-degrading enzymes and feruolyl esterases. Enzyme and Microbial Technology 28: 70–80.

18. 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.

19. 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.

20. 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.

21. Clark, G.S.1990. Vanillin. Perfumer and Flavourist 15: 45-54.

22. De Jong, E., Van Berkel, W.J.H., Van der Zwan, R.P and De Bont, J.A.M. 1992. Purification and characterization of vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*: a novel aromatic alcohol oxidase containing covalently bound FAD. European *Journal* of Biochemistry 208: 651–657.

23. Ernst, G. 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. Free Radical Biology and Medicine 13: 435−448.

24. Falconnier, B., Lapierre, C., Lesage-Meessen, L., Yonnet, G., Brunerie, P., Ceccaldi, B.C., Corrieu, G and Asther, M. 1994. Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-37: identification of metabolic pathways. Journal of Biotechnology 37: 123-132.

25. 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.

26. Furukawa, H., Wieser, M., Morita, H and Nagasawa, T .1999. Microbial synthesis of coniferyl alcohol by the fungus *Byssochlamys fulva* V107. Bioscience and Biotechnology and Biochemistry 63: 141–1142.

27. Furukawa, H., Morita, H., Yoshida, T and Nagasawa, T. 2003. Conversion of isoeugenol into vanillic acid by *Pseudomonas putida* I58 cells exhibiting high isoeugenol-degrading activity. Journal of Bioscience and Bioengineering 96: 401–403.

28. 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.

29. Gurujeyalakshmi, G and Mahadevan, A. 1987. Dissimilation of ferulic acid by *Bacillus subtilis*. Current Microbiology 16: 69–73.

30. Han, D., Ryu, J.Y., Lee, H and Hur, H.G. 2013. Bacterial biotransformation of phenylpropanoid compounds for producing flavor and fragrance compounds. journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry 56: 125-133.

31. Hocking, M.B. 1997.Vanillin: synthetic flavoring from spent sulfite liquor. Journal of Chemistry and Education 74: 1055-1059.

32. Huang, Z., Dostal, L and Rosazza J.P.N. 1994. Mechanism of ferulic acid conversion to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. The Journal of Biological Chemistry 268: 23594–23598.

33. Hua, D., Ma, C., Lin, S., Song, L., Deng, Z., Maomy, Z., Zhang, Z., Yu, B and Xu, P. 2007. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: identification of major metabolites. Journal of Biotechnology 130: 463–470.

34. Ishikawa, H., Schubert, W.J and Nord, F.F. 1963. Investigations on lignins and lignification. XXVIII. The degradation by *Polyporus versicolor* and *Fomes fomentarius* of aromatic compounds structurally related to softwood lignin. Archives of Biochemistry and Biophysics 100: 140–149.

35. Ishikawa, H., Schubert, W.J and Nord, F.F. 1963. Investigations on lignins and lignification. 28. The degradation by *Polyporus versicolor* and *Fomes fomentarius* of aromatic compounds structurally related to softwood lignin. Archives of Biochemistry and Biophysics 100:140–149.

36. Kamoda, S and Samejima, M. 1991. Cloning of a ligno stilbene-alpha, beta-dioxygenase gene from *Pseudomonas paucimobilis* TMY 1009–expression in *E. coli*. Agricultural Biology and Chemistry 55: 1411-1412.

37. 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.

38. 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.

39. Kaur, B and Chakraborty, D. 2013. Biotechnological and Molecular Approaches for Vanillin Production: a Review. Applied Biochemistry and Biotechnology 169: 1353–1372.

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

41. Krishnamohan and Khanna, S. 1994. Metabolism of ferulic acid by *Alcaligenes paradoxus*. Indian Journal of Microbiol 34: 303-306.

42. Labuda, I.M., Goers, S.K and Keon, K.A. 1992. Bioconversion process for the production of vanillin. Patent application US 5128253.

43. Lesage-Meessen, L., Stentelaire, C., Lomascolo, A., Couteau, D., Asther, M., Moukha, S., Record, E., Sigoillot, J.C and Asther, M. 1999. Fungal transformation of ferulic acid from sugar beet pulp to natural vanillin. Journal of the Science of Food and Agriculture 79: 487–490.

44. Li, Y.H., Sun, Z.H., Zhao, L.Q and Xu, Y. 2005. Bioconversion of isoeugenol into vanillin by crude enzyme extracted from soybean. Applied Biochemistry and Biotechnology 125: 1–10.

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

46. Lomascolo, A., Stentelaire, C., Asther, M and Laurence, L.M. 1999. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavors for the food industry. Trends Biotechnology 17: 282-289.

47. Markus, P.H., Peters, A.L.J and Roos, R. 1992. Process for the preparation of phenylaldehydes. European patent EP 542348.

48. 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.

49. Muheim, A and Lerch, K. 1999. Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. Applied Microbiology and Biotechnology 51: 456–461.

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

51. Nazareth, S and Mavinkurve, S. 1986. Degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol by *Fusarium solani* (Mart) Sacc. Candian Journal of Microbiology 32: 494–497.

52. Noort, R.V. 2002. Introduction to Dental Materials, 2d Edition, Elsevier Health Sciences, ISBN 0723432155.

53. 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.

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

55. Overhage, J., Priefert, H., Rabenhorst, J and Steinbüchel, A. 1999. Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (vdh) gene. Applied Microbiology and Biotechnology 52: 820–828.

56. Overhage, J., Steinbüchel, A and Priefert, H. 2003. Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology 69: 6569–6576.

57. Plaggenborg, R., Overhage, J., Loos, A., Archer, J.A.C. Lessard, Philip, Sinskey, A.J., Steinbüchel, A and Priefert, H. 2006. Potential of *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol. Applied Microbiology and Biotechnology 72: 745–755.

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

59. Rabenhorst, J and Hopp, R. 1991. Process for the preparation of vanillin. Patent application EP0405197.

60. Rabenhorst, J. 1996. Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. Applied Microbiology and Biotechnology 46: 470–474.

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

61. Rahouti, M., Seigle-Murandi, F., Steiman, R and Eriksson, K.E. 1989. Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. Applied and Environmental Microbiology 55: 2391-2398.

62. Ramachandra, R.S., Ravishankar, G.A and Venkataraman, L.V. 1996. An improved process for the preparation of vanillin. Indian Patent 1022/DEL/96.

63. 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 & Biotechnology 15: 457-471.

64. Ryu, J.Y., Seo, J., Unno, T., Ahn, J.H., Yan, T., Sadowsky, M.J and Hur, H.G. 2010. Isoeugenol monooxygenase and its putative regulatory gene are located in the eugenol metabolic gene cluster in *Pseudomonas nitroreducens* Jin1. Archives of Microbiology 192(3)**:** 201-209.

65. 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.

66. Sutherland, J.B., Crawford, D.L and Pomento III, A.L. 1983. Metabolism of p-coumaric and ferulic acids by *Streptomyces setonii*. Canadian Journal of Microbiology 29: 1253-1257.

67. Tadasa, K .1977. Degradation of eugenol by a microorganism. Agricultural Biology and Chemistry 41: 925–929.

68. Tadasa, K and Kayahara, H. 1983. Initial steps of eugenol degradation pathway of a microorganism. Agricultural Biology and Chemistry 47: 2639–2640.

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

70. 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.

71. Unno, T., Kim, S.J., Kanaly, R.A., Ahn, J.H., Kang, S.I and Hur, H.G. 2007. Metabolic characterization of newly isolated *Pseudomonas nitroreducens* Jin1 growing on eugenol and isoeugenol. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 8556–8561.

72. 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.

73. Washisu, Y., Tetsushi, A., Hashimoto, N and Kanisawa, T. 1993. Manufacture of vanillin and related compounds with *Pseudomonas*. Japan Patent 5227980.

74. Xu, P., Hua, D and Ma, C. 2007. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural

flavor production. Trends Biotechnology 25: 571-576.

75. 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.

76. 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.

77. 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

78. Zhao, L.Q., Sun, Z.H., Zheng, P and He, J.Y. 2006. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 with addition of resin H D-8. Process Biochemistry 41: 1673–1676.

Biological Production of Natural Vanillin Based on the Microbial Conversion of Phenylpropanoids

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

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

[2] Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

The rising popularity of natural aroma products has triggered off significant research activities to use biocatalysts for the production of natural flavor compounds. Vanillin is of major interest for the flavor and fragrance industry. It has been widely used as a flavoring agent in foods, perfumes, beverages, pharmaceuticals and medical industries. Two main approaches for the production of natural vanillin are direct extraction from botanical sources and microbial bioconversion. Considering the various applications of vanillin and increasing consumer-led demand for natural vanillin and also due to the fact that the extraction from botanic sources is very time consuming, expensive and does not satisfy the worldwide demand, alternative biotechnological methods for its production are being constantly explored. Microbial bioconversion has been extensively exploited to make modifications in the structure of the organic compounds. Microbial cells can be efficiently used as a eco-friendly biocatalyst in the conversion of substrates as precursors into value-added products. The current review emphasizes the microbial bioconversion routes involved biological production of natural vanillin based on the microbial conversion of henylpropanoids.

Keywords: Natural vanillin, Biotransfromation, Microbial cells, Phenylpropanoid substrates