

## بیوترانسفورماسیون بتا-پینن به آلفا-پینن توسط بیوکاتالیزورها

فرشته جوکار کاشی<sup>۱\*</sup>، جمشید فولادی<sup>۱\*\*</sup>، منصور بیات<sup>۲</sup>  
گروه زیست شناسی دانشگاه الزهراء<sup>۱</sup>، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، (تهران، خیابان ونک، تلفن: ۰۲۱-۸۰۴۴۰۵۰۵-۸)  
e-mail: fereshtehjookar@yahoo.com

دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات<sup>۲</sup>

### چکیده:

ترکیبات آروماتیک طبیعی بویژه از نوع اترهای روغنی در صنعت طعم دهنده ها و خوشبوکننده ها بعنوان ترکیبات پایه از اهمیت بسزایی برخوردار هستند. (Eyal shimoni et al., 2000) ترپنها بطور وسیعی بعنوان ترکیباتی با خواص اسانسی در صنایع بهداشتی و آرایشی و غذایی کاربرد دارند. پینن ها ترکیبات مونوترپنی که بیوسنتز آنها در دنیای گیاهان با متابولیت میانی گرانیل پیروفسفات کاملاً شناخته شده است. (کوشک آبادی، ۱۳۷۹) پینن ها ترکیبات تشکیل دهنده بسیاری از روغن های گیاهی مانند روغن باریجه می باشند. باریجه النورزینی است که از گیاهی شبیه رازیانه بدست می آید. صمغ بعبارت دیگر روغن این گیاه منبعی سرشار از بتا پینن می باشد. این پینن میتواند سوبسترای ارزان قیمتی برای تولید ترکیب هم خانواده خود یعنی آلفا پینن بشمار آید. (Annonymouse, 2003) در این تحقیق سعی بر شناسایی و ایزوله کردن میکروارگانسیم هائی است که بتوانند بعنوان بیوکاتالیزور واکنش تبدیل بتا- به آلفا- پینن را انجام دهند. برای این منظور سوش هائی از گیاه باریجه، خاک طبیعی اطراف آن و همچنین صمغ حاصل از گیاه جداسازی شد که بر اساس تفاوت های مورفولوژیکی از هم تفکیک شدند. بدین ترتیب ۲۴ سویه شناسایی و ایزوله شدو برای انتخاب هر کدام بعنوان بیوکاتالیزور واکنش بیوترانسفورماسیون مذکور، سیستم تست غربال تعریف و در محیط واکنش تک تک آزمایش شدند.

کلمات کلیدی: بیوترانسفورماسیون + اترهای روغنی + میکروارگانسیم + باریجه

## Biotransformation $\beta$ -pinene to $\alpha$ -pinene by biocatalysors

F.Jookar, J.fooladi, Alzahra university, Faculty of science, Phone: 021-804405-8

e-mail: fereshtehjookar@yahoo.com

M.bayat, Islamic azad university

### Abstract:

Natural aroma compound are of major interest to the flavour and fragrance industry. Terpenes are widely used as flavorings in essence industry. Pinenes are monoterpene that may be a significant factor affecting bacterial activities in nature. Pinenes are the principal constituent of many plants such as galbanum (Ferula spp), Galbanum is an oleoresin the exude from an umelliferous plant similar to fennel. Galbanum is a greate source of  $\beta$ -pinene.  $\beta$ -pinene is a low-cost substrate for biotransformation to  $\alpha$ -pinene. The present work describe the isolation of microorganism capable of producing  $\alpha$ -pinene from  $\beta$ -pinene. Microorganism were isolated from soil, plants, galbanum gum. Diffrent microorganism were isolated based on their morphology. 24 microorganism were isolated. The bioconversion capabilities of microorganism were tested in growing culture with  $\beta$ -pinene

Key word: biotransformation, Essential oil, Microorganism, galbanum

e-mail: fereshtehjookar@yahoo.com

### مقدمه:

میکروارگانسیم ها با تعداد زیاد ی آنزیم های مختلف در موقعیتی قرار دارند تا واکنش های گوناگون شیمیائی را انجام دهند. واکنشهایی که برای رشد و بقای سلولی الزامی می باشند. با آنزیم های ضروری (constitutive) و یا القائی توسط سوبسترا میکروارگانسیم ها می توانند مراحل از یک سری واکنشهای کمپلکس را کاتالیز کنند. تحت واژه بیوترانسفورماسیون (Biotransformation) واکنش های تجزیه و تبدیلی تعریف می شود که توسط میکروارگانسیم ها و یا آنزیم های آنها انجام می گیرد (بطور کلی تحت عنوان بیوکاتالیزورها در این پدیده از آنها یاد می شود). تا به امروز تعداد بیشماری واکنش های کاتالیز شده بیولوژیکی (بویژه میکروبیولوژیکی) از انواع تجزیه و تبدیل ها از قبیل اکسیداسیون و احیاء، ایزومریزاسیون و... در منابع علمی ارائه شده اند که کم و بیش راههای صنعتی آنها نیز در سنتز شیمیائی مواد بخش مهمی بخود اختصاص داده اند. بعبارت دیگر در صنعت شیمی امروزه پروسه بیوترانسفورماسیون اهمیت زیادی پیدا کرده است. در سالهای اخیر در صنعت اسانس فرایندهای بیوتکنولوژیکی برای تولید طعم دهنده ها طبیعی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. دستیابی به اترهای روغنی با خواص ویژه و با منشاء طبیعی اولیه توسط واکنشهای بیوترانسفورماسیونی بعنوان راه های جدید سنتز اینگونه مواد جزء لاینفک این صنعت بشمار می آید. Murray et al.,

(1991) در این تحقیق سعی بر ایزوله کردن میکروارگانیسم هائی است که بتوانند واکنش تبدیل بتا - پینین به آلفا - پینین را در یک واکنش یک مرحله ائی انجام دهند. بتا- و آلفا- پینین جزء دسته موترپنهای دو حلقه ائی (bicyclic) که در صنعت اسانس بعنوان ترکیبات پایه ائی اثرهای روغنی بشمار می آیند و با توجه به منشاء طبیعی آنها بویژه میزان قابل توجه بتا - پینین در اغلب عصاره های گیاهی و اهمیت بیشتر ترکیب آلفا - پینین که در طبیعت نسبت به دیگری کمتر سنتز میشود بنابراین واکنش تبدیلی مذکور بسیار حائز اهمیت است اگر چه در دهه ۸۰ میلادی قرن گذشته سنتز شیمیائی آلفا - پینین با موفقیت صورت گرفته است اما طبیعی بودن این مونوترپن با خواص ویژه بیشتر مورد نیاز صنعت اسانس می باشد. (S.k.yoo et al., 2000) آلفا- و بتا-پینین دو ایزومر که در واکنشهای متعددی از قبیل ایزومریزاسیون، اکسیداسیون، هیدراسیون، استیلایسیون و غیره به کار میروند و در تهیه ترپنویدهای زیادی مانند اوسیمن، ترپینولن، ترپینین هیدرات، ترپینول و کامفور مورد استفاده قرار می گیرند. ترکیباتی که در ساخت فرآورده های صنعتی فراوانی از قبیل صابون، کرم، عطر، بخور، پاک کننده ها، چسب، داروهای ضد عفونی کننده، حشره کش ها، چرم و حلال ها و... بکار می روند. از آلفا - پینین در مقادیر کم برای تهیه اسانس های سنتزی گلایی، جوز هندی و کاج و امثالهم استفاده می شود. دو ترکیب بتا- و آلفا- پینین بطور طبیعی در عصاره ها و صمغ های گیاهی با غلظت های مختلف یافت می شوند که از آن جمله میتوان از گیاه باریجه (*Galbanum Ferula*) نام برد. گیاه از نوع علفی پایا دارای ساقه ضخیم به ارتفاع ۱ - ۲ متر است که در مناطق مختلف ایران (البرز، دماوند، خراسان، شیراز و...) رویده و همچنین در افغانستان و ترکستان نیز یافت میشود البته کیفیت صمغ گیاه از نوع ایرانی بعبارت دیگر روغن بدست آمده از آن مرغوبتر و بیشتر مورد تقاضای صنعت اسانس دنیا می باشد. صمغ گیاه بنام باریجه بنا به شرایط جغرافیائی (از قبیل آب و هوا...) حاوی میزان بویژه قابل توجهی ترکیب بتا- پینین نسبت به دیگر اثرهای روغنی موجود در صمغ می باشد. (پرویز باباخانلو و همکاران، ۱۳۷۷)

#### مواد و روشها:

در این تحقیق برای جدا سازی میکروارگانیسم ها بعنوان بیوکاتالیزور واکنش تبدیل بتا- به آلفا-پینین از نمونه گیاه باریجه، خاک اطراف گیاه و صمغ حاصل از آن بعنوان منبع تأمین سوشها استفاده شد. گیاه باریجه به این دلیل انتخاب شد که منبعی سرشار از ترکیب بتا-پینین در مقایسه با دیگر صمغ های گیاهی ایرانی بشمار می آید و بهمین دلیل نیز احتمال حضور میکروارگانیسم هائی با خصوصیات ذکر شده در چنین نمونه هائی زیاد است. گیاه مورد نظر از مناطق کویری کاشان و صمغ آن از استان خراسان تهیه شد. سپس از هر نمونه سوسپانسیون تهیه شد: ۱۰ گرم از هر نمونه را در ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی (۰/۹ % NaCl) ریخته و خوب بهمزده می شود. البته از آنجا که صمغ باریجه روغنی و خوب حل نمی شود از امولسفاير (Tween 80) برای حل شدن آن استفاده شد. ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون حاصل را در محیط کشتگاهی پایه و افتراقی کشت داده می شود. محیط کشتگاهی مورد نظر عبارتند از: **MAC, BHA, SD, EMB, BA, NA, CA** - کشتگاهی مورد نظر را بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون شدند. میکروارگانیسم های رشد کرده بر اساس تفاوتهای مورفولوژی از هم تفکیک شدند. سپس برای دستیابی به بیوماس مورد نیاز در راه اندازی تست **Screening** بعبارت دیگر واکنش بیوترانسفورم-ماسیون (**Biotransformation**) کشت تک تک سوشهای ایزوله شده بر روی محیط کشت کمپلکس بدین شرح انجام گرفت:

به این ترتیب که از سوش های مورد نظر کشت ۲۴ ساعت تهیه شد سپس از این کشت یک لوب در محیط کشت کمپلکس شامل (۵ گرم عصاره مخمر و ۱۰ گرم پیتون و ۲۰ گرم گلوکز در یک لیتر) به میزان ۵۰ میلی لیتر در فلاسک ۲۵۰ میلی لیتری تلقیح می شود و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون می شود و پس از ۱۸ ساعت که کدورت آن برابر نیم مکفارلند شد یک میلی لیتر از آن را در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کمپلکس تلقیح می شود که به مدت ۲۴ ساعت و هم زدن با دور **۱۴۰ rpm** در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون می شود تا اینکه کامل کدر شود سپس آن را با دور **۱۱۳۰۰ g** و ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ می شود. لازم به ذکر است که **PH** محیط برای باکتری ها ۶/۸ و برای قارچ ها ۵/۳ در نظر گرفته شد.

از آنجا که میکروارگانیسم های جدا شده از صمغ ممکن است بتوانند صمغ را متابولیزه کنند برای این منظور آزمایشی طراحی شده است به این ترتیب که از صمغ به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده شد بنابر این محیط کشت های کمپلکس برای تولید بیوماس برای هریک از میکروارگانیسم ها تهیه گردید به این ترتیب که یکبار گلوکز به عنوان منبع کربن و بار دیگر صمغ به عنوان منبع کربن انتخاب شد.

از طرفی به دلیل اینکه قسمت عمده صمغ را ترکیب بتا-پینین تشکیل می دهد بنابر این آزمون دیگری را برای سنجش بیوترانسفورم-ماسیون بتا-پینین انجام شد به این ترتیب که در محیط کشت با **PH** برابر ۸ در حضور بافر **KH2PO4, K2HPO4** و ۱ گرم بتا-پینین و ۱ گرم از بیومس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دور **110 rpm** انکوباسیون می شود که در زمان های صفر و ۵ ساعت و ۱۵ ساعت نمونه گیری انجام می گردد نمونه های مورد نظر را به وسیله پترولیوم اثر استخراج می شود و سپس توسط روش **Thin layer chromatography** مورد سنجش قرار می گردید.

### نتایج و بحث:

تا کنون تحقیقات زیادی در رابطه با واکنشهای بیوترانسفورماسیونی اترهای روغنی صورت گرفته است که در آنها باکتریها، قارچها و حتی اسپورهای قارچی بعنوان بیوکاتالیزور عمل کرده اند و گزارش شده است که از چنین ترکیباتی بعنوان منبع کربنی و انرژی استفاده و حتی با ایجاد تغییرات درون مولکولی ساختار آنها ترکیبات جدیدی تولید شده اند که از آن جمله میتوان سوش سودوموناس فلورنسانس (**Pseudomonas fluorescens**) را نام برد که قادر به متابولیزه کردن ترکیب آلفا-اکسید پینن ( **$\alpha$ -Pinene oxide**) می باشد. این میکروارگانیسم معمولاً، در تبدیل ایزوپروپونوئیدهای طبیعی نقش کلیدی دارد. (H.zorn et al., 2004)

در این تحقیق سعی بر جداسازی میکروارگانیسم هایی است که بتوانند واکنش تعریف شده تبدیل ایزومر بتا-پینن به آلفا-پینن را کاتالیز بکنند. با این وصف ۲۴ سویه ایزوله و شناسائی شدند که ابتدا قادر به رشد بر روی صمغ گیاه باریجه می باشند ۱۵ سوش از خود گیاه و خاک اطراف آن که شامل ۵ بکتری و ۱۰ قارچ می باشند. از صمغ گیاه هم ۹ سویه ایزوله که شامل ۵ باکتری و ۴ قارچ می باشد.

با توجه به اینکه سویه های ذکر شده از محیط هائی جدا شده که اترهای روغنی حضور دارند پس انتظار می رود که بتوانند این ترکیبات را نیز متابولیزه یا بعبارت دیگر بعنوان منبع کربن و انرژی بپذیرند بنابراین مشاهده شد که در محیط کمپلکس با حضور صمغ بعنوان منبع کربن و انرژی بیوماس بیشتری تولید می شود.

بطوریکه سوش های حاصل از صمغ پس از ۴۸ ساعت در محیط کشت کمپلکس (صمغ به عنوان منبع کربن) بیوماس بیشتری نسبت به شرایط یکسان و در محیط کمپلکس (گلوکز به عنوان منبع کربن) تولید می کنند و بنابراین میتوان نتیجه گرفت که این سوش ها صمغ را بعنوان منبع کربن و انرژی استفاده می کنند. صمغ شامل بتا- و آلفا-پینن و  **$\Delta^3$ -carene** ، **subinene** و **1,3,5 undecatriene** می باشد که بیش از نیمی از این روغن را بتا-پینن تشکیل می دهد پس احتمال متابولیزه کردن آن توسط سویه ها امکانپذیر می باشد. (Annonymouse,2003)

### منابع:

- 1-Eyal Shimoni , Uzi Ravid , Yuval Shoham 78, (2000) 1-9 ,Isolation of bacillus sp. Capable of transforming isoeugenol to vanillin
- 2-Essential oil from Aqua Oleum (2003),www.aqua-oleum.com.uk/essentials/long/galbanum.htm.
- 3-H.Zorn,F.Neuser,R.G.Berger(2004) ,Degradation of  $\alpha$ -pinene oxide and [H7]-2,5,6-trimethyl-hept-(2E) enoic acide by pseudomonas flurescense NCIMB 11761,Journal of Biotechnology 107 :255-263
- 4-Murray, W.D. und Duff, S.J.B.(1991): Food enzymology, Band 2, Elsevier Applied science, London und New York, S. 105 – 141

۵-تحقیقات گیاهان دارویی و معطر -وزارت جهاد سازندگی معاونت آموزش و تحقیقات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع نوشته پرویز بابا خانلو، مهدی میرزا ،فاطمه سفید کن و لطیفه احمدی ،محمد مهدی بدازنده و ناطمه عسگری

۶-شیمی دارویی ترکیبات استروئید نوشته دکتر هوشنگ کوشک آبادی انتشارات دانشگاه تهران سال ۱۳۷۷