استرپتوکوکوس ترموفیلوس مهندسی شده برای سنتز وانیلین طبیعی و کاربرد آن در صنعت غذا

مراحم آشنگرف[a*]، ایرج نحوی[b]

[a] *استادیار میکروبیولوژی گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران*
[b] *استاد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۵/۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۸/۲۲

چکیده

مقدمه: افزایش تقاضا در مصرف فرآورده های غذایی طبیعی ضرورت استفاده از میکروارگانیسم ها بعنوان کاتالیست‌های طبیعی ایمن را در سنتز وانیلین طبیعی از سوبستراهای پروپنیل بنزنی بیان می‌کند. وانیلین با توجه به خواص ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی بعنوان نگهدارنده و چاشنی در صنایع غذایی کاربرد دارد. هدف از این پژوهش، طراحی و ساخت باکتری پروبیوتیک نوترکیب *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و استفاده از آن بعنوان کاتالیست در تبدیل اسید فرولیک به وانیلین طبیعی بود.

مواد و روش‌ها: ژن‌های ساختاری *fcs* (فرولویل کوآنزیم A سنتتاز) و *ech* (انویل کوآنزیم A هیدراتاز/آلدولاز) با استفاده از مهندسی ژنتیک کلون سازی و بیان شد. پلاسمید نوترکیب pNZ8048-T5/*ech*/*fcs* به *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* به عنوان میزبان جهت سنتز وانیلین طبیعی نوترکیب از اسید فرولیک ترانسفورم و بوسیله تکنیک‌های هضم دو آنزیمی، Nested PCR، Colony PCR و تعیین توالی تایید شد. از تکنیک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای بررسی سطح بیان ژن‌های کلون شده استفاده شد.

یافته‌ها: پلاسمید نوترکیب طراحی شده این امکان را فراهم ساخت که دو ژن *fcs* و *ech* در وکتور بیانی pNZ8048 تحت کنترل پروموتور فاژی T5 در سیستم میزبانی *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* بطور موفقیت آمیز بیان گردد. براساس نتایج بدست آمده، باکتری نوترکیب *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* قادر به تبدیل اسید فرولیک به وانیلین با راندمان مولی ۶۲ درصد پس از ۱۲ ساعت واکنش و وانیلیل الکل با راندمان مولی ۱۸ درصد، پس از ۱۶ ساعت واکنش زیست تبدیلی بود.

نتیجه گیری: مطالعه اخیر نخستین گزارش از کاربرد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در تولید وانیلین محسوب می‌شود. با توجه به جایگاه و اهمیت اقتصادی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک (ایمن بودن آنها و امکان کاربرد مستقیم در صنایع غذایی) نتایج حاصل از این مطالعه را می توان بعنوان پایه ای برای تولید فرآورده‌های غذایی طبیعی در باکتری‌های پروبیوتیک مهندسی شده استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: *اسید فرولیک، استرپتوکوکوس ترموفیلوس، کلون سازی، وانیلین نوترکیب*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: m.ashengroph@uok.ac.ir

مقدمه

میکروارگانیسم‌ها با توجه به تنوع متابولیکی، اختصاصیت سوبسترا و عملکرد در سیستم‌های دو فازی بعنوان کاتالیست‌های طبیعی بالقوه در تولید بسیاری از فرآورده‌های صنعتی با ارزش افزوده بالا در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، دارویی، پزشکی، کشاورزی و شیمیایی استفاده می‌شوند (Liese *et al*., 2006). وانیلین (۴- هیدروکسی-۳- متوکسی بنزآلدئید) یکی از پرمصرف‌ترین مواد حلقوی معطر با کاربردهای بسیار وسیع در صنایع غذایی بعنوان چاشنی غذا و نوشیدنی‌ها، در صنایع دارویی بعنوان حدواسط در سنتز داروهایی از جمله ال-دوپا، پاپاورین و تری متوپریم، در صنایع آرایشی و بهداشتی بعنوان اجزای تشکیل دهنده انواع کرم‌های آرایشی و ادکلن‌ها و در پزشکی به دلیل خواص آنتی اکسیدانی و آنتی‌توموری می‌باشد (Achterholt *et al*., 2000; Overhage *et al*., 2003). از مصارف عمده وانیلین در صنایع غذایی می‌توان به بهبود طعم انواع غذاها و نوشیدنی‌ها (Fitzgerald *et al*., 2003)، نگهدارنده غذایی از طریق جلوگیری از رشد اکثر مخمرها و کپک‌های فاسد کننده مواد غذایی و همچنین ممانعت از رشد اکثر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی (Matamoros-Leon *et al*., 1999) و به عنوان یک آنتی اکسیدان بالقوه در بسیاری از مواد غذایی و دارویی به ویژه در مواد غذایی کمپلکس حاوی اسیدهای چرب چند غیراشباعی (Burri *et al*., 1989) اشاره نمود. بهترین منبع دسترسی به وانیلین طبیعی استخراج فیزیکی مستقیم از گیاه *Vanilla Planifolia* از خانواده ارکیداسه می باشد. اساسا تکثیر و زراعت گیاه وانیل بسیار سخت و طاقت فرسا بوده و مسئله مهمتر اینکه در دانه‌های سبز و بی‌طعم کشت شده، وانیل وجود ندارد و این دانه‌ها جهت تولید وانیل باید به مدت ۳ تا ۶ ماه تحت فرآیند فرآوری (curing) قرار بگیرند که این فرآیند خود شامل ۴ تیمار مختلف از جمله مرحله کشتن (توقف رشد و تخریب دیواره و غشاء)، تعریق، خشک کردن و مرحله ذخیره‌سازی (Conditioning) می‌باشد (Ramachandra & Ravishankar, 2000). وانیل فرآوری شده حدود ۲ درصد وزن خشک سلولی را تشکیل داده و همراه با آن بیش از ۱۵۰ ترکیب دیگر شامل انواع لاکتون‌ها، الکل‌ها، اترها، استات‌ها، آلدئیدها و هیدروکربن‌ها وجود دارد. با توجه به اینکه تولید هر کیلوگرم وانیلین از گیاه وانیلا نیازمند حدود ۵۰۰ کیلوگرم از دانه‌های سبز فرآوری شده بوده و این عمل خود نیازمند گرده افشانی بیش از ۴۰۰۰۰ گل می‌باشد (Hansen *et al*., 2009)، بنابراین استخراج وانیل از گیاه وانیلا بسیار پرهزینه، زمان بر و دارای راندمان پایین بوده که منجر به افزایش قیمت تمام شده وانیلین استخراجی (بین ۱۲۰۰ تا ۴۰۰۰ دلار برای هر کیلوگرم بسته به درجه خلوص) می‌گردد. علیرغم قیمت بالای وانیلین استخراجی با توجه به طبیعی بودن و اطمینان از کیفیت و سالم بودن آن، از مشتریان بسیار زیادی به ویژه در سطح اروپا و آمریکا برخوردار است (Priefert *et al*., 2001). بنابراین، تولید وانیلین طبیعی از گیاه وانیلا پلانی فولیا در کنار ارزش بالای آن قادر به برآوردن تقاضای جهانی نیست و تنها حدود ۵ درصد از نیاز بازار را تامین می‌کند. از این رو وانیلین عمدتا از طریق سنتز شیمیایی و با حضور سوبستراهایی از جمله لیگنین، سولفیت لیکور، گایاکول و سافرول صورت می‌گیرد که حدود ۲۵۰ برابر ارزان تر از وانیلین طبیعی است (Priefert *et al*., 2001). 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 فرآورده‌های بیوتکنولوژی به ویژه فرآورده‌های غذایی، در بسیاری از صنایع غذایی محدود و حتی در مواردی هم ممنوع گردیده است (Krings & Berger, 1998). بنابراین روند روبه رشد تقاضای مصرف جهانی برای تولید ترکیبات معطر طبیعی به دلیل اطمینان از کیفیت مطلوب و سالم بودن انها، رو به افزایش است. با توجه به افزایش روزافزون تقاضا برای مصرف وانیلین طبیعی، رویکردهای بیوتکنولوژی شامل استفاده از سلول‌های میکروبی طبیعی و مهندسی شده بعنوان بیوکاتالیست در سنتز زیستی وانیلین طبیعی از سوبستراهای پروپنیل بنزنی از جمله اوژنول، ایزواوژنول، اسید وانیلیک و اسید فرولیک به عنوان راهبردهای نوین توسعه داده شده است. در مقاله مروری منتشر شده توسط آشنگرف و نحوی تولید زیستی وانیلین طبیعی از سوبستراهای پروپنیل بنزنی از جمله اسید فرولیک با استفاده از سلول‌های میکروبی با جزئیات بطور کامل شرح داده شده است (آشنگرف و

نحوی، ۱۳۹۳). از میان سوبستراهای بکار گرفته شده برای سنتز وانیلین طبیعی با استفاده از سلول‌های میکروبی بعنوان بیوکاتالیست، اسید فرولیک (۳- (۴- هیدروکسی- 5- متوکسی فنیل)-1- پروپینویک اسید) فرمول بسته $C_{10}H_{10}O_4$ با توجه به اینکه بصورت فراوان در دیواره سلول گیاهان و خصوصا در سبوس غلات و تفاله چغندرقند یافت می شود و همچنین با توجه مشخص شدن مسیر دقیق متابولیسم اسید فرولیک به وانیلین، بنابراین بعنوان یک ماده خام اولیه تجدید شدنی و ارزان قیمت بوسیله میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ashengroph *et al*., 2012).

مشکل اصلی در تولید میکروبی وانیلین، اکسیداسیون بالای وانیلین به وانیلیک اسید و یا احیای آن به وانیلیل الکل می باشد. هر دوی این واکنش‌های جانبی منجر به کاهش چشمگیری در غلظت وانیلین تولیدی می‌شوند (Xu *et al*., 2007). از آنجایی که وانیلین یک ترکیب آلدئیدی است، بنابراین دارای واکنش پذیری بالا با ترکیبات سلولی میکروارگانیسم‌ها به ویژه با گروه‌های تیولی آنزیمی بوده که همین امر منجر به سمیت بسیار بالای وانیلین برای بیشتر میکروارگانیسم‌ها شده است، بنابراین در بیشتر میکروارگانیسم‌ها به منظور کاهش سمیت وانیلین، واکنش‌های بیوکانورژن وانیلین رخ می‌دهد (Priefert *et al*., 2001). بنابراین با توجه به نرخ بالای بیوکانورژن وانیلین، لزوم استفاده از استراتژی‌های مختلف جهت کاهش یا مهار بیوکانورژن الزامی می‌باشد. استراتژی‌های پیشنهادی شامل استفاده از رزین‌های اختصاصی جاذب وانیلین، استفاده از عوامل آنتی اکسیدانت، ایجاد جهش‌های هدفمند و مهندسی متابولیک است. در این میان مهندسی متابولیک و طراحی سویه‌های نوترکیب مهندسی شده با هدف کاهش نرخ بیوترانسفورماسیون وانیلین و افزایش وانیلین تولیدی در مخلوط واکنش‌های بیوترانسفورماسیون موفق‌ترین استراتژی بکار گرفته شده بوده است (Barghini *et al*., 2007; Yamada *et al*., 2008). هدف از این پژوهش، طراحی و ساخت باکتری پروبیوتیک نوترکیب *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و استفاده از آن بعنوان کاتالیست طبیعی ایمن در تبدیل زیستی سوبسترای اسید فرولیک به وانیلین طبیعی بود.

مواد و روش‌ها

- مواد شیمیایی، محیط‌های کشت، سویه‌های باکتری و حامل‌های پلاسمیدی

از محیط‌های کشت آماده Luria Bertani (ساخت شرکت مرک) و M17 (ساخت شرکت دیفکو) برای رشد سویه‌های باکتری استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین در غلظت نهایی 100 µg/ml و کلرامفنیکل در غلظت نهایی 25 µg/ml در محیط‌های کشت استفاده شد. سویه‌های باکتری استفاده شده شامل *Sterptococcus thermophilus* DSM 20617، *E. coli* pGLB8b، *E. coli* pNZ8048، *E. coli* JM109 (pGEM-*ech*) و *E. coli* JM109 (pGEM-*fcs*) بودند. از دو وکتور pGBL8b و pNZ8048 (شکل ۱) جهت آزمایشات کلونینگ استفاده شد. همه سویه‌های باکتری و وکتورهای بکار گرفته شده در آزمایشات کلونینگ از دانشگاه میلان ایتالیا تهیه شد.

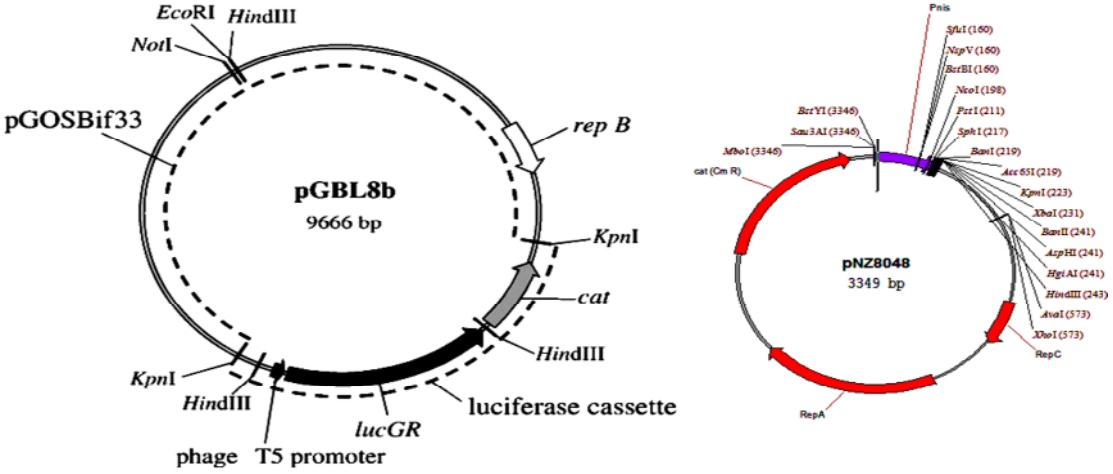
- تکثیر و استخراج پلاسمید

به منظور تکثیر وکتورهای پلاسمیدی ذکر شده، ابتدا باید عملیات تکثیر این وکتورها در سویه‌های باکتری مربوطه شامل *E. coli* JM109 (pGEM-*fcs*)، *E. coli* JM109 (pGEM-*ech*)، *E. coli* pGLB8b و *E. coli* pNZ8048 انجام شود و سپس وکتور تکثیر شده، استخراج شود. برای این منظور یک کلنی از سویه‌های مذکور در ۱۰ میلی‌لیتر محیط مایع LB انتخابی (حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین یا کلرامفنیکل) تلقیح شده و برای مدت زمان ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دور شیکر ۲۰۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن وکتورهای تکثیر شده با استفاده از کیت تخلیص DNA پلاسمیدی (شرکت QIAGEN) استخراج شدند. وکتورها در بافر TE یا آب MiliQ استریل در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. استخراج پلاسمید های تکثیر شده با استفاده از کیت استخراج پلاسمید تهیه شده از شرکت QIAGEN طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

- طراحی پرایمر و انجام تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

طراحی پرایمرهای اختصاصی، با توجه به توالی ژن‌های

ech، *fcs* و پروموتور T5 موجود در وکتورهای پلاسمیدی pGEM-*fcs*، pGEM-*ech* و pGBL8b، با استفاده از نرم افزار Vector NTI 6 (*InforMax* Technical Support, *USA*) انجام پذیرفت. در جدول ۱ مشخصات پرایمرهای مذکور آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت: دمای واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و سپس ۳۲ تا ۳۵ سیکل به ترتیب با دمای واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دماهای اتصال (۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای پرایمرهای اختصاصی ژن *ech*، ۵۳ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای پرایمرهای اختصاصی طراحی شده پروموتور فاژی T5، ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای پرایمرهای اختصاصی طراحی شده قطعه ژنی T5-*ech* و ۶۱ درجه سانتی گراد برای پرایمرهای اختصاصی ژن *fcs*) و دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۴۰ ثانیه انجام شد. پس از آن بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. پس از تایید قطعه محصول PCR بر روی ژل، در مرحله بعد جهت تخلیص باند مورد نظر بسته به کیفیت باند ظاهر شده از کیت های آزمایشگاهی تخلیص محصولات PCR شامل UltraClean PCR Clean-Up Kit (شرکت MO BIO) و QIAquick Gel Extraction (شرکت QIAGEN) استفاده گردید.



شکل ۱- نقشه ژنتیکی وکتورهای پلاسمیدی pGBL8b و pNZ8048

وکتور pGBL8b، ۹۶۶۶ جفت باز دارد و حاوی ژن کد کننده آنزیم لوسیفراز می باشد. وکتورpNZ8048 دارای ۳۳۴۹ جفت باز می باشد و حاوی ژن مقاوم به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل می باشد.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای آزمایشات کلونینگ با هدف طراحی سویه نوترکیب مهندسی شده جهت تهیه وانیلین طبیعی

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	طول محصول مورد انتظار
T5-FOR	5′-CTTAAACAACGGAGGACTA-3′	205 bp
T5-REV	5′-CCTTCGTAGTTGCTCATAGTTAATTTCTCCTC-3′ (Complementary)	
ech-FOR	5′-GAGGAGAAATTAACTATGAGCAACTACGAAGGT-3′ (Complementary; start codon)	831 bp
ech-REV	5′-TCAGCGTTTATACGCCT-3′ (stop codon)	
ech-PstI	5′-GAACTGCAGTTATCACTAGCGTTTATACGCTTGCAG-3′ (Structural support PstI)	1041 bp
T5-BamHI	5′-CCTTGGAAGGATCCCAACGGAGGACTAGCGTA-3′ (Structural support BamHI)	
fcs-XbaI	5′-TAGTCTAGATCATTACTATGGTGCGTCTACACGCAA-3′ (Structural support XbaI; stop codon)	1875 bp
fcs-KpnI	5′-CCTTGGAAGGTACCGAAAGGAGTCCATATGGACTGCGAAACCCTCT-3′ (Structural support KpnI; RBS+ Spacer; start codon)	

- ساخت وکتور بیانی pNZ8048 حامل ژن *ech* و تحت پروموتور فاژی T5

به‌منظور ساخت وکتور فوق، ابتدا وکتورهای پلاسمیدی pGBL8b، pNZ8048 و pGEM-*ech* را تکثیر نموده و سپس وکتورهای تکثیر شده از سویه های باکتری مربوطه استخراج گردید. در مرحله بعد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده T5-FOR/T5-REV و *ech*-FOR/*ech*-REV، به ترتیب پروموتور فاژی T5 و ژن *ech* با واکنش PCR تکثیر شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی پروموتور فاژی T5 و *ech* به ترتیب حاوی ۲۰۵ و ۸۳۱ جفت باز می‌باشد. پس از این مرحله، قطعه T5-*ech* که حاوی تقریبا ۱۰۴۱ جفت باز بوده در طی یک واکنش Nested PCR تکثیر شد. لازم به توضیح است که قطعه مذکور به گونه‌ای تکثیر شده که در دو انتها دارای جایگاه برش آنزیمهای BamHI/PstI می‌باشد. پس از این مرحله قطعه تکثیر شده T5-*ech* و وکتور pNZ8048 تحت عمل برش دو آنزیمی قرار گرفته است. در نهایت عمل الحاق صورت گرفته که در طی آن ژن *ech* در پایین دست پروموتور T5 و در یک قالب خوانشی قرار گرفته است. در ادامه به منظور قرار دادن قطعه T5-*ech* در وکتور بیانی pNZ8048، باید وکتور و محصول PCR تخلیص شده تحت برش آنزیمی قرار گیرند. از آنجایی که محصول PCR در دو انتها دارای جایگاه برش با دو آنزیم محدود کننده PstI و BamHI می‌باشد، ابتدا محصول PCR پس از تکثیر و تخلیص توسط این دو آنزیم برش داده شد. هم زمان با این کار وکتور بیانی pNZ8048 نیز توسط دو آنزیم محدود کننده PstI و MobI برش داده شد. غلظت و خلوص DNAی حاصل از نمونه‌های هضم آنزیمی وکتور و محصولات PCR برای وارد کردن DNA به وکتور مورد نظر یعنی تکنیک الحاق مهم است. برای این منظور ابتدا پلاسمید و قطعه الحاقی (Insert) را تعیین غلظت نموده سپس بسته به طول این دو ملکول DNA، حجم معینی از هرکدام را برداشته به طوری که نسبت مولی قطعه خارجی به پلاسمید حداقل ۳ به ۱ باشد تا عمل الحاق با موفقیت صورت گیرد.

- ساخت وکتور بیانی pNZ8040 حامل ژن‌های *ech* و *fcs* تحت پروموتور فاژی T5

به منظور ساخت وکتور فوق ابتدا قطعه ژنی *fcs* به گونه ای تکثیر داده شد که در دو انتها دارای جایگاه برش آنزیم‌های XbaI/KpnI باشد و در ضمن دارای یک جایگاه اتصال ریبوزومی (Ribosome binding site) قوی قبل از کد شروع (ATG) باشد. سپس محصول PCR و وکتور pNZ8048-T5/*ech* تحت عمل برش دو آنزیمی قرار گرفتند. پس از آن، عمل الحاق صورت گرفت که طی آن ژن *fcs* در پائین دست ژن *ech* ودر یک قالب خوانشی قرار گرفت. مراحل ترانسفورماسیون وکتور pNZ8048-T5/*ech/fcs* به درون باکتری میزبانی *S. thermophilus* از طریق تکنیک الکتروپوریشن انجام شد. پس از انجام ترانسفورماسیون به منظور اطمینان از تولید وکتورهای نوترکیب و درستی ترانسفورماسیون، روی کلنی های موجود در محیط کشت انتخابی، کلنی PCR انجام شد.

- شرایط کروماتوگرافی استفاده شده در HPLC

از تکنیک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) برای بررسی سطح بیان ژن های کلون شده استفاده شد. در دستگاه HPLC (مدل Jasco Pu-980، آمریکا) از ستون Hypersil ODs C18 [اندازه قطر ذرات فاز ثابت ۵ میکرون]، به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر داخلی 4.6 میلی‌متر و از محافظ ستون C18 به طول ۱ سانتی‌متر و قطر داخلی 4.6 میلی‌متر استفاده شد. فاز متحرک متشکل از متانول: آب (به ترتیب به نسبت‌های ۳۵ به ۶۵ حجمی/حجمی) حاوی ۱ درصد حجمی/حجمی تری فلورو اسید استیک. حجم تزریق شده ۲۰ میکرولیتر، طول موج آشکارساز ۲۷۰ نانومتر و میزان جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و همه مراحل آزمایش در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انجام شد. تحت شرایط کروماتوگرافی ذکر شده، زمان‌های بازداری برای وانیلیل الکل، وانیلیک اسید، وانیلین و اسید فرولیک به ترتیب در زمان های ۴/۲۶، ۶/۲۷، ۷/۴۷ و ۱۲/۷ دقیقه حاصل شده است.

یافته ها

- نتایج تکثیر وکتورهای پلاسمیدی pGLB8b، pGEM-*ech*، pGEM-*fcs* وpNZ8048

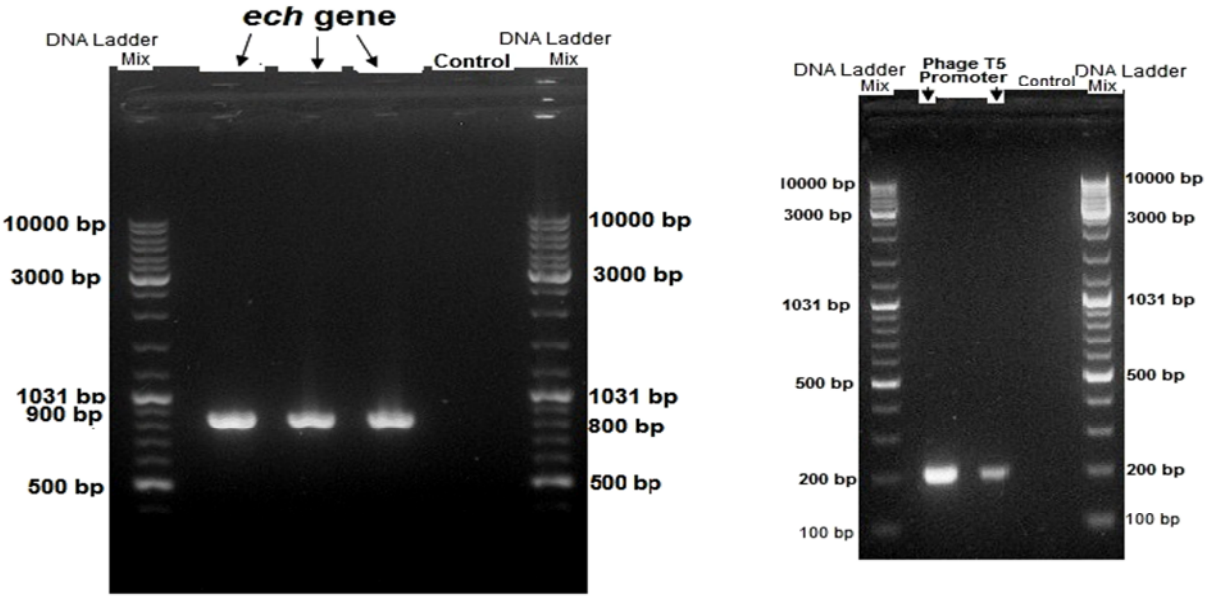
برای ساخت سویه نوترکیب مناسب با پتانسیل تبدیل کنندگی اسید فرولیک به وانیلین نیازمند ساخت یک کاست

ژنی مناسب در وکتور بیانی (pNZ8048) و ترانسفورماسیون آن به باکتری میزبان می‌باشیم. برای ساخت کاست ژنی مربوطه ابتدا وکتورهای پلاسمیدی حاوی پروموتور T5/RBS1، ژن‌های کاتابولیکی *ech* و *fcs* و همچنین وکتور بیانی pNZ8048 داخل سویه‌های باکتری مربوطه تکثیر شده و سپس توسط کیت استخراج شدند. تصاویر حاصل از ژل‌های مربوطه در شکل۲ نشان داده شده است. همانطور که در شکل می‌بینیم نمونه‌ها فاقد اسمیر بوده و بنابراین برای عملیات بعدی مناسب می‌باشند.

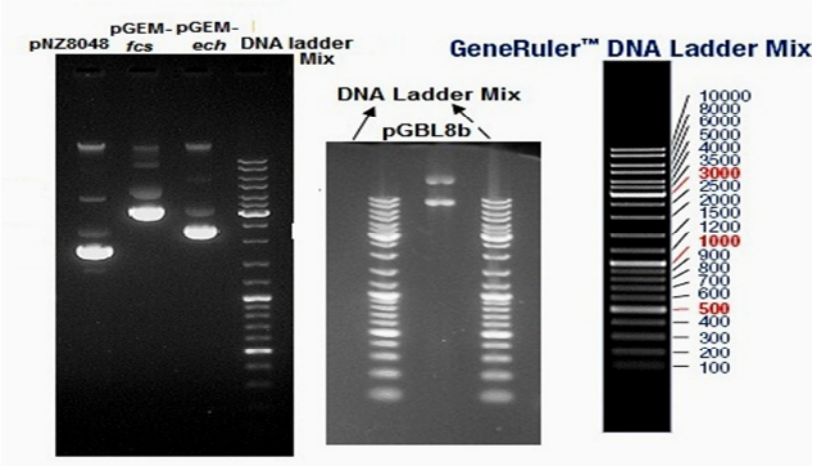
- نتایج تکثیر پروموتور فاژی T5 و ژن *ech* با استفاده از تکنیک PCR

پس از استخراج پلاسمید pGLB8b حاوی پروموتور فاژی T5، از سویه *E. coli* مربوطه، پروموتور T5 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده T5-FOR وT5-REV توسط تکنیک PCR تکثیر شد. همزمان ژن *ech* موجود در پلاسمید استخراج شده pGEM-*ech* نیز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ech-FOR و ech-REV و توسط تکنیک PCR تکثیر شد. نتایج حاصل از آزمایشات تکثیر در شکل ۳ نشان داده شده است. با مشاهده قطعات ۲۰۵ و ۸۳۱ نوکلئوتیدی حاصل از محصولات PCR، با طول پروموتور فاژی T5 و ژن *ech* ، نتایج حاصل از تکثیر مورد تایید واقع شد.

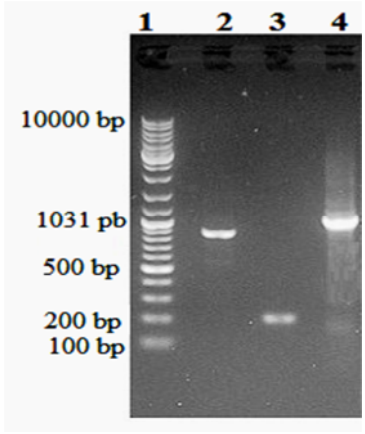
پس از تکثیر جداگانه قطعات T5 و *ech* با استفاده از تکنیک PCR و تخلیص متعاقب این قطعات از طریق کیت‌های آنزیمی، با هدف ساخت وکتور بیانی pNZ8048/T5/*ech* حامل ژن *ech* تحت پروموتور فاژی T5، قطعه T5-*ech* از طریق یک واکنش PCR دو مرحله ای (single cycle PCR و nested PCR) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده T5-BamHI و -*ech* PstI تکثیر گردید. در انتهای 5́ پرایمر Forward جایگاه برش آنزیم BamH1 و در انتهای 5́ پرایمر Reverse جایگاه برش آنزیم PstI قرار داشت، تا پس از تکثیر قطعه مورد نظر، این دوجایگاه در دو طرف قطعه T5-*ech* ایجاد شوند. طول قطعه تکثیر شده حدود ۱۰۴۰ جفت نوکلئوتید می‌باشد که با مجموع طول T5 و *ech* با توجه به اضافه کردن جایگاه‌های برش آنزیمی در دو طرف، برابر است. نتایج حاصل از تکثیر قطعه T5-*ech* در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۲- الگوی حرکت وکتورهای پلاسمیدی روی ژل آگارز



شکل ۳- نتایج الکتروفورز تکثیر ژن ech و پروموتور فاژی T5 بر روی ژل آگارز

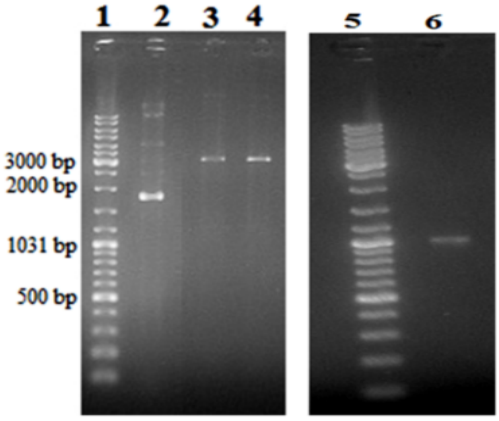


شکل ٤- نتایج الکتروفورز تکثیر قطعه T5-*ech* روی ژل آگارز . ۱: مارکر وزن ملکولی، ۲: ژن *ech* ، ۳: قطعه T5 و ٤: قطعه T5-*ech*

- نتایج الحاق قطعه تکثیر شده T5-*ech* به وکتور بیانی pNZ8048

به منظور قرار دادن قطعه T5-ech درون وکتور pNZ8048، ابتدا وکتور و محصول PCR تخلیص شده بوسیله کیت، تحت برش دو آنزیمی قرار گرفتند. با توجه به جایگاه‌های برش روی قطعه T5-ech، این قطعه با آنزیم‌های BamHI و PstI بریده شد. سپس با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ قطعه مورد نظر (۱۰۳۶ bp) با تیغ استریل بریده و به ویال‌های ۱/۵ میلی لیتری استریل منتقل شد. سپس با استفاده از کیت استخراج DNA از روی ژل، قطعه مورد نظر مطابق دستورالعمل کیت، خالص شد. هم زمان با این کار وکتور بیانی pNZ8048 نیز توسط آنزیم های محدود کننده MboI و PstI برش داده شد. نتایج الکتروفورز قطعه T5-*ech* و پلاسمید دایجست شده تخلیص شده (جهت کلونینگ) در شکل ۵ نشان داده شده است.

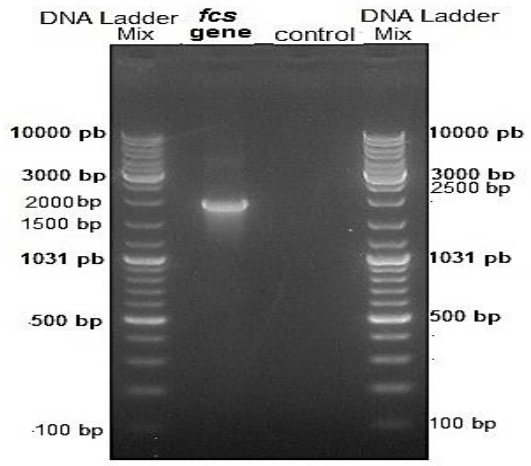
به دنبال هضم دو آنزیمی پلاسمید pNZ8048 و قطعه T5-*ech*، انتهاهای چسبنده مشابهی در دو طرف پلاسمید و قطعه تکثیر شده ایجاد شد. پلاسمید خطی شده و قطعه تکثیر یافته به نسبت مولی ۱ به ۳ توسط کیت لیگاسیون و مطابق با دستورالعمل ارائه شده در کیت به هم متصل شدند. پس از اطمینان حصول پیدا کردن از کلون شدن ژن *ech* از طریق تعیین توالی، آزمایشات مربوط به کلونینگ ژن *fcs* انجام پذیرفت که نتایج آن در ادامه شرح داده شده است.



شکل ٥- الکتروفورز پلاسمید pNZ8048، پلاسمید pNZ8048 دایجست شده (جهت کلونینگ) و قطعه T5-*ech* دایجست شده (جهت کلونینگ) بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ۱ و ٥ : مارکر وزن ملکولی، ۲: پلاسمید pNZ8048 دایجست نشده، ۳ و٤: پلاسمید pNZ8048 دایجست شده با MobI و PstI، ٦: قطعه T5-*ech* دایجست شده با BamHI و PstI.

- نتایج تکثیر ژن *fcs* با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

پس از استخراج پلاسمید pGEM-*fcs* حاوی قطعه ژنی *fcs* از سویه *E. coli* pGEM-*fcs* ، ژن *fcs* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده fcs-KpnI وfcs-XbaI توسط تکنیک PCR تکثیر شد. پرایمرهای استفاده شده به گونه‌ای طراحی شده اند که در انتهای 5́ پرایمر رفت یک جایگاه برش آنزیم KpnI و یک جایگاه اتصال ریبوزومی مناسب با قابلیت ترجمه شدن موثر در باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و همچنین در انتهای 5́ پرایمر برگشت جایگاه برش آنزیم XbaI قرار داشت تا پس از تکثیر قطعه مورد نظر این جایگاه‌ها در دو طرف ژن *fcs* ایجاد شوند. طول قطعه تکثیر شده حدود bp ۱۸۷۵ بود که با طول ژن *fcs* برابر است. طول ژن *fcs* حدود bp ۱۸۵۷ است که با توجه به اضافه نمودن جایگاه های برش آنزیمی و جایگاه اتصال ریبوزومی در دو طرف ژن، اندازه آن به حدود pb ۱۸۷۵ می رسد. الگوی حرکت روی ژل آگارز برای قطعه تکثیر شده (*fcs*) در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ٦- الگوی حرکت قطعه ژنی تکثیر شده (fcs) روی ژل آگارز ۱ درصد.

در ادامه به منظور قرار دادن قطعه‌ی *fcs* به درون وکتور نوترکیب pNZ8048T5/*ech*، ابتدا استخراج وکتور در مقیاس زیاد با استفاده از روش معمول انجام شد. سپس وکتور و محصول PCR استخراج شده از ژل (ژن *fcs*) تحت تاثیر برش دو آنزیمی قرار گرفتند. در نتیجه انتهاهای چسبنده مشابهی در دو طرف پلاسمید و قطعه تکثیر شده ایجاد شد. پلاسمید و قطعه تکثیر یافته توسط کیت Ligation به هم متصل شدند. همچنین برای بررسی Self ligation وکتور، واکنش دیگری انجام شد که در آن هیچ یک از محصولات PCR به مخلوط واکنش Ligation اضافه نشدند.

- ترانسفورماسیون وکتور بیانی (pNZ8048T5/*ech*/*fcs*) به داخل باکتری *Streptococcus thermophilus* (سویه DSM 20617^T)

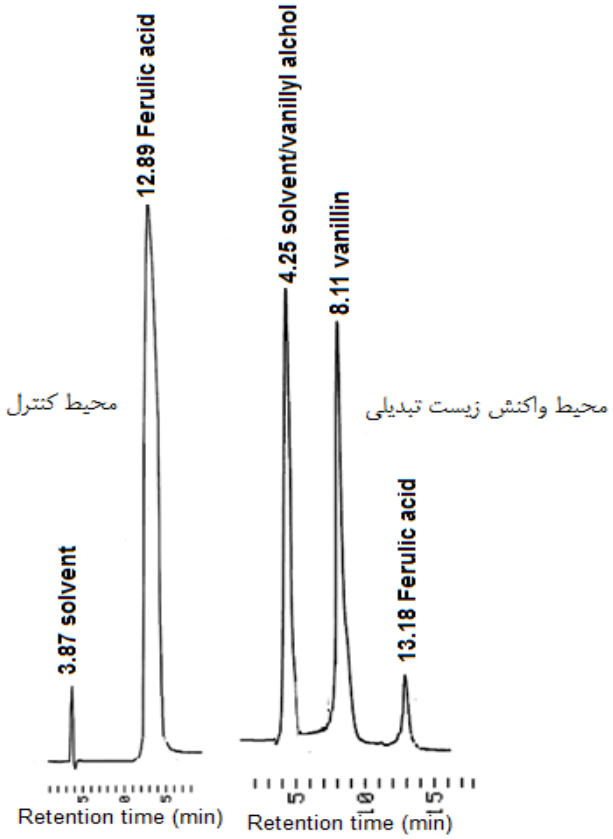
هدف نهایی از انجام این تحقیق بیان کاست ژنی کاتابولیکی طراحی شده در باکتری پروبیوتیک *S. thermophilus* به منظور تهیه وانیلین طبیعی از سوبسترای اسید فرولیک و امکان استفاده مستقیم از این بیوکاتالیست مهندسی شده در صنایع مختلف به ویژه صنایع غذایی بود. برای ترانسفورماسیون وکتور بیانی pNZ8048T5/ech/fcs به درون باکتری مستعد *S. thermophilus* (سویه DSM 20617^T)، از تکنیک الکتروپوریشن استفاده شد.

- بررسی بیان ژن های *ech* و *fcs* تحت پروموتور فاژی T5 در *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* مهندسی شده

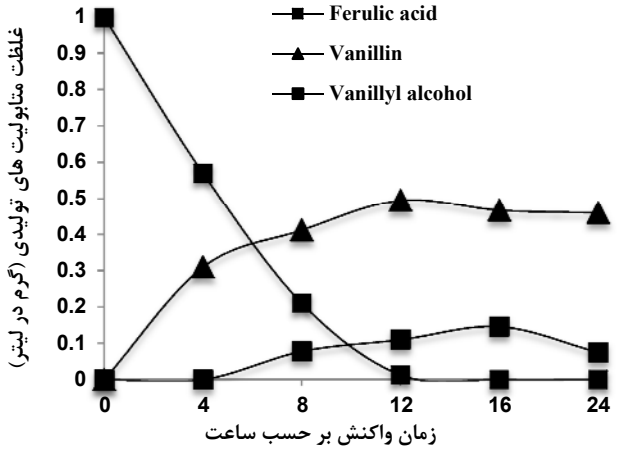
در این قسمت از تحقیق، فعالیت ژن های *ech* و *fcs* (تحت پروموتور فاژی T5) در *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* مهندسی شده مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا سلول‌های باکتری در محیط M17 حاوی ۲ درصد قند لاکتوز تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی رشد داده شدند (ساعت ۲۴ ام، OD_{600nm}= 5.5). پس از برداشت سلول‌ها و شستشوی آنها در محیط بافری فسفات، از این سلول‌ها به عنوان سلول‌های در حال استراحت برداشت شده در انتهای فاز رشد لگاریتمی در محیط بافری حاوی ۱ گرم در لیتر سوبسترای اسید فرولیک برای مطالعات بیوترانسفورماسیون استفاده شد (Ashengroph *et al*., 2012). همانگونه که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، وانیلیل الکل (Rt=4.25 min) و وانیلین (Rt= 8.11 min) به عنوان متابولیت‌های حاصل از بیوکانورژن فرولیک اسید (Rt=12.89 min) تشخیص داده شده است. این متابولیت‌های تشکیل شده در مخلوط بیوکانورژن، در

کشت‌های کنترل (حاوی فرولیک اسید و بدون تلقیح سویه باکتری ترانسفورم شده) انکوبه شده تحت شرایط مشابه، مشاهده نشدند. این نتایج نشان می‌دهد که ژن‌های *ech* و *fcs* (تحت پروموتور T5) به صورت موفقیت آمیز در وکتور بیانی pNZ8048 کلون شده اند. بنابراین امکان استفاده از این پلاسمید نوترکیب (pNZ8048T5/*ech*/*fcs*) به عنوان وکتور بیانی جهت تهیه سویه میزبانی *S. thermophilus* مهندسی شده با قابلیت تبدیل زیستی اسید فرولیک به وانیلین امکان پذیر شد.

در ادامه روند تبدیل زیستی اسید فرولیک به وانیلین و وانیلیل الکل تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت سویه مهندسی شده مورد ارزیابی کمی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۸ می‌توان دید، در طی ۴ ساعت اولیه از شروع واکنش، اسید فرولیک شروع به تجزیه شدن سریع نموده و وانیلین به میزان (۰/۳۱ گرم در لیتر) به عنوان متابولیت اصلی درمخلوط بیوکانورژن تجمع پیدا کرده است. با افزایش زمان واکنش تا ساعت ۱۲ ام، سوبسترای اسید فرولیک به طور کامل از محیط بیوترانسفورماسیون تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت سویه مهندسی شده حذف شده است. بیشترین غلظت وانیلین تولید شده (۰/۵۱ گرم در لیتر) توسط سویه مذکور پس از ۸ ساعت از شروع واکنش بیوترانسفورماسیون حاصل شده است. در این تحقیق راندمان مولی تهیه وانیلین طبیعی از سوبسترای فرولیک اسید حدود ۶۲ درصد بود. همانگونه که در شکل مشاهده می شود، بین ساعات ۸ تا ۱۶ ام میزان وانیلین ثابت مانده که این امر می‌تواند باعث تسهیل در بازیافت این متابولیت از محیط شود. بیشترین میزان وانیلیل الکل تولید شده در پروسه مذکور حدود ۰/۱۳ گرم در لیتر بوده که پس از ۱۶ ساعت از شروع واکنش بیوکانورژن مشاهده شده است. در این فرآیند هیچگونه تجمعی از متابولیت اسید وانیلیک در مخلوط بیوترانسفورماسیون مشاهده نشده است.



شکل ۷- کروماتوگرام های HPLC بدست آمده از تبدیل زیستی سوبسترای اسید فرولیک تحت شرایط سلول های در حال استراحت باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس ترانسفورم شده با وکتور بیانی pNZ8048T5/*ech*/*fcs* پس از ۸ ساعت واکنش زیست تبدیلی



شکل ۸- تبدیل زیستی اسید فرولیک به وانیلین و وانیلیل الکل تحت سلول های در حال استراحت سویه نوترکیب *S. thermophilus* DSM 20617^T (pNZ8048-T5/*ech*/*fcs*)

بحث

در سال‌های اخیر روش‌های نوترکب ژن و مهندسی ژنیتک بعنوان ابزاری قدرتمند برای ساخت سویه‌های نوترکب مناسب حاوی ژن‌های مربوط به مسیرهای متابولیکی خاص، توجه جهانی گسترده‌ای را به خود جلب کرده است. توسعه و گسترش دانش ما در ارتباط با آنزیم‌های مسئول در بیوکانورژن انواع پش سازهای پروپنیل بنزنی از جمله اسید فرولیک، اوژنول و ایزواوژنول به وانیلین و همچنین شناسایی و تشخیص ژن‌های کد کننده آنزیم‌های فوق، فرصت‌های جدیدی را برا ی مهندسی متابولیک به منظور ساخت سویه‌های نوترکیب حاوی ژنهای کد کننده مسیرهای شناخته شده بیوسنتز وانیلین و با هدف جلوگیری از تجزیه بیشتر وانیلین تولید شده و در نتیجه افزایش راندمان مولی آن، پدید آورده است. کلونینگ و بیان ژن‌های مسیر متابولیسمی تولید وانیلین از سوبستراهای پروپنیل بنزنی توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلفی انجام شده است. Overhage و همکاران در سال ۲۰۰۳، یک فرآیند دو مرحله ای برای تولید وانیلین طبیعی از سوبسترای اوژنول پیشنهاد نمودند. در مرحله اول با استفاده از ژن‌های کدکننده مسیر متابولیکی اوژنول به فرولیک اسید در سویه نوترکیب *E. coli* XL1-Blue (pSK*vao*mP*calA*m*calB*) موفق به تولید ۴/۶ گرم در لیتر اسید فرولیک از ۵ گرم در لیتر اوژنول با راندمان مولی حدود ۹۳ درصد شدند. در مرحله دوم با استفاده از ژن‌های کد کننده مسیر بیوسنتزی اسید فرولیک به وانیلین در سویه نوترکیب *E. coli* (pSK*ech*E/H*fcs*) ، ۰/۳ گرم در لیتر وانیلین از ۴/۶ گرم در لیتر اسید فرولیک ایجاد شد. علت راندمان پایین در این مرحله تجزیه بیشتر وانیلین به وانیلیل الکل گزارش شد (Overhage *et al*., 2003). مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۵ توسط Yoon و همکاران صورت گرفت. این محققین ژن‌های مسیر متابولیسمی فرولیک اسید به وانیلین را از سویه‌های *Amycolatopsis* sp. HR104 و *Delftia acidovorans* جدا و پس از کلونینگ در وکتور بیانی pBAD24 [تحت کنترل پروموتور القایی آرابینوز (pBAD)] به منظور تولید وانیلین به صورت نوترکیب از ۲ سویه میزبانی *E. coli* استفاده نمودند. تحت شرایط بهینه شده سلول‌های رویشی سویه *E. coli* نوترکیب حاوی ژن‌های *Amycolatopsis* sp. HR104 نزدیک به ۵۸۰ میلی‌گرم در لیتر وانیلین از ۱ گرم در لیتر اسید فرولیک حاصل گردید (Yoon *et al*., 2005). Barghini و همکاران در سال ۲۰۰۷ بوسیله یک سویه مهندسی شده *E. coli* JM109 با استفاده از ژن‌های تجزیه کننده اسید فرولیک اسید (*fcs* و *ech*) از باکتری *Pseudomonas flurescens* BF13، راندمان مولی وانیلین بیش از ۷۰ درصد پس از ۳ ساعت انکوباسیون تحت شرایط بهینه شده سلول‌های در حال استراحت ایجاد شده است (Barghini *et al*., 2007). در مطالعه صورت گرفته دیگری توسط Yamada و همکاران کلونینگ ژن ایزواوژنول مونواکسیژناز از باکتری *Pseudomonas putida* IE24 در وکتور بیانی pET21a تحت کنترل پروموتور T7 و بیان آن در سویه میزبانی *E. coli* BL21 (DE3) منجر به ایجاد ۲۸ گرم در لیتر وانیلین از ۳۸ گرم

در لیتر ایزواوژنول پس از ۶ ساعت انکوباسیون، تحت شرایط بهینه شده سلول‌های در حال استراحت و در حضور ۱۰ درصد دی متیل سولفوکساید گردیده است (Yamada *et al.*, 2008). علیرغم سابقه استفاده از باکتری اشریشیاکلی مهندسی شده در ساخت فرآورده‌های نوترکیب از جمله وانیلین، بزرگترین مشکل در مسیر تولید، حضور اندوتوکسین باکتریایی است که این امر امکان بکارگیری محصولات خالص نوترکیب مهندسی شده با استفاده از سویه‌های اشریشیاکلی را در صنایع دارویی و غذایی با مشکل مواجه کرده است. در این مطالعه هدف ما به وجود آوردن یک پلاسمید نوترکیب حاوی کاست ژنی اسید فرولیک به منظور تولید وانیلین نوترکیب در باکتری پروبیوتیک *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* بود. با توجه به ایمنی طبیعی باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و پوشش دادن استانداردهای GRAS (Generally regarded as safe)، از باکتری مهندسی شده مذکور می توان بعنوان یک بیوکاتالیست ایمن جهت سنتز وانیلین طبیعی نوترکیب با امکان بکارگیری مستقیم در صنایع غذایی استفاده نمود. پلاسمید نوترکیب pNZ8048-T5/*ech*/*fcs* این امکان را فراهم ساخت که بتوانیم دو ژن *fcs* [جداسازی شده از باکتری *Pseudomonas putida* (با شماره دسترسی AJ536324 در بانک ژنی NCBI) و *ech* [جداسازی شده از باکتری *Pseudomonas fluorescens* (با شماره دسترسی AJ536325 در بانک ژنی NCBI)] را در وکتور بیانی pNZ8048 تحت کنترل پروموتور فاژی T5 در سیستم میزبانی *Streptococcus thermophilus* بطور موفقیت‌آمیز کلون و بیان نماییم. براساس نتایج بدست آمده، سویه مهندسی شده *S. thermophilus* $DSM20617^T$ قادر به تبدیل اسید فرولیک به وانیلین با راندمان مولی ۶۲ درصد پس از ۱۲ ساعت واکنش زیست تبدیلی و وانیلیل الکل با راندمان مولی ۱۸ درصد پس از ۱۶ ساعت بود. با مقایسه راندمان وانیلین نوترکیب حاصل از این پژوهش با سایر مطالعات صورت گرفته در ارتباط با تولید وانیلین از اسید فرولیک در سویه‌های نوترکیب مهندسی شده به خوبی می توان به اهمیت نتایج حاصل پی برد. لازم به ذکر است که راندمان بدست آمده تحت شرایط غیربهینه شده بوده و بنابراین پس از استفاده از فرآیندهای بهینه سازی می‌توان امیدوار بود که سویه مذکور بعنوان یک بیوکاتالیست مناسب جهت تهیه وانیلین نوترکیب استفاده گردد.

نتیجه گیری

اگرچه گزارشات متعددی در ارتباط با تولید وانیلین نوترکیب در سویه های مهندسی شده *E. coli* وجود دارد، با این حال مطالعه اخیر نخستین گزارش از کاربرد باکتری *S. thermophilus* نوترکیب در تبدیل زیستی اسید فرولیک به وانیلین محسوب می شود. با توجه به اهمیت باکتری پروبیوتیک *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در حفظ و ارتقای سلامت انسان و امکان بکارگیری آن در تولید انبوه فرآورده‌های لبنی، نتایج حاصل از این مطالعه را می‌توان بعنوان پایه ای برای تولید وانیلین نوترکیب در سویه‌های میزبانی ایمن با امکان بکارگیری در صنایع غذایی بعنوان یک بیوکاتالیست ایمن برای معطر نمودن انواع محصولات لبنی استفاده نمود. تحقیقات بیشتر بر روی باکتری مهندسی شده *S. thermophilus* با هدف افزایش غلظت وانیلین نوترکیب، افزایش Productivity پروسه، بررسی پایداری پلاسمید نوترکیب و حضور ژن‌ها در آن لازم است.

منابع

آشنگرف، م. و نحوی، ا. (۱۳۹۳). تولید زیستی وانیلین طبیعی از سوبستراهای فنیل پروپانوئیدی بوسیله زیست تبدیلی با استفاده از سلول‌های میکروبی. مجله پژوهش‌های سلولی و ملکولی (مجله زیست شناسی ایران)، سال ۲۷، شماره ۳، صفحات ۳۱۶-۳۳۴.

Achterholt, S., Priefert, H. & 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.

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

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

Barghini, P., Gioia D. D., Fava, F. & Ruzzi, M. (2007). Vanillin production using metabolically engineered Escherichia coli under non-growing conditions. Microbial Cell Factories, 6, 1-13.

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

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

Hansen, E. H., Møller, L., Kock, G. R., Bűnner, C. M., Kristensen, C., Jensen, O. R., Okkels, F. T., Olsen, C. E., Motawia, M. S. & Hansen, J. (2009). De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (Schizosaccharomyces pombe) and baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae). Applied and Environmental Microbiology, 75(9), 2765-2774.

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

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

Matamoros-Leon, B., Argaiz, A. & 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.

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

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

Ramachandra, R. S. & Ravishankar, G. A. (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 289–304.

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

Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T. & Nagasawa, T. (2008). Vanillin production using Escherichia coli cells over-expressing isoeugenol monooxygenase of Pseudomonas putida. Biotechnol Letters, 30(4), 665-670.

Yoon, S. H., Li, C., Lee, Y. M., Lee, S. H., Kim, J. E., Choi, M. S., Seo, W. T., Yang, J. K., Kim, J. Y. & Kim, S. W. (2005). Production of vanillin from ferulic acid using recombinant strains of Escherichia coli. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 10, 378-384.