جداسازی و شناسایی باکتری نمک دوست نسبی*Halobacillus* sp. SL-7 با پتانسیل زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا

مراحم آشنگرف* و مینا صیادی

ایران، سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

ال- دوپا (۳و ۴ دی هیدروکسی فنیل ال- آلانین) اولین بار در دهه ۱۹۶۰میلادی معرفی شد و همچنان به‌عنوان موثرترین دارو در درمان بیماری پارکینسون است. در این مطالعه، برای نخستین بار جداسازی سویه های باکتری نمک دوست نسبی تجزیه کننده ی ال-تیروزین و امکان استفاده از آنها بعنوان کاتالیزگر در زی‌تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا انجام شد. با استفاده از تکنیک غنی سازی در محیط حاوی ال-تیروزین، سویه باکتری تجزیه کننده ال-تیروزین که بیشترین توانایی را در زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا را دارا بود با استفاده از روش های فنوتیپی و ملکولی شناسایی و توالی نوکلئوتیدی 16S rDNA آن در بانک ژنی NCBI به عنوان*Halobacillus* sp. SL7 ثبت شد. با هدف افزایش راندمان واکنش زی تبدیلی و جلوگیری از تجزیه بیشتر متابولیت تولیدی (ال-دوپا)، میزان ال-دوپای تولید شده تحت استراتژی سلولهای در حال استراحت و با استفاده از روش های بهینه سازی تک فاکتوری در سویه مذکور سنجش شد. براساس نتایج بدست آمده، بهترین شرایط برای زی تبدیلی عبارت است از ال- تیروزرین در غلظت ۱/۵ گرم در لیتر.، توده زیستی در غلظت ۷/۵ گرم در لیتر، یون مس در غلظت ۰/۰۳ گرم در لیتر و پپتون در غلظت ۱ گرم در لیتر بعنوان سوبسترای کمکی. تحت شرایط بهینه شده فوق غلظت ال- دوپای بدست آمده پس از ۳۶ ساعت گرماگذاری ۰/۷۵ گرم در لیتر با راندمان مولی ۴۶/۲٪ است. مطالعه اخیر نخستین گزارش از زی تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا بوسیله سول های در حال استراحت سویه باکتری نمک دوست نسبی *Halobacillus* sp. SL7 است.

واژه های کلیدی: زی تبدیلی، ال- تیروزین، ال- دوپا، سلول در حال استراحت، *Halobacillus* sp. SL7

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۷-۳۳۶۶۴۶۰۰ ، پست الکترونیکی: m.ashengroph@uok.ac.ir

مقدمه

بیماری پارکینسون برای اولین بار توسط دانشمند بریتانیایی دکتر جیمز پارکینسون در سال ۱۸۱۷ میلادی توصیف شد. او این بیماری را فلج لرزان نامید که امروزه آن را تحت عنوان بیماری پارکینسون می‌شناسند. بیماری پارکینسون یک بیماری دستگاه عصبی مرکزی در بزرگ‌سالان مسن‌تر می باشد که مشخصه آن سفتی عضلانی پیش‌رونده تدریجی، لرزش و از دست رفتن مهارت‌های حرکتی است. این اختلال هنگامی رخ می‌دهد که نواحی خاصی از مغز توانایی خود در تولید دوپامین (یکی از ناقلین عصبی در مغز) را از دست می‌دهند (۱۸). ال- دوپا اولین بار در دهه ۱۹۶۰ میلادی معرفی شد و با اینکه پس از کشف این دارو، ده‌ها داروی جدید برای بیماری پارکینسون معرفی شد، با این وجود همچنان به-عنوان موثرترین دارو در درمان بیماری پارکینسون می باشد (۱۴). به رغم فراوانی روش های سنتزی در تولید داروهای شیمیایی، امروزه استفاده از فرآیندهای زیست تبدیل میکروبی در تولید متابولیت های طبیعی دارویی با ارزش افزوده بالا، سهم مهمی از سرمایه گذاری‌های مرتبط با

شرکت‌های داروسازی و زیست فناوری را در برگرفته است. منظور از زیست تبدیل میکروبی، استفاده از سلول-های کامل میکروبی یا آنزیم‌هایشان به‌عنوان زیست کاتالیزگر برای تبدیل سوبستراهای طبیعی به ترکیبات طبیعی با ساختار مشابه اما با ارزش افزوده‌ی بالا می باشد. در واقع سلول میکروبی به‌عنوان زیست کاتالیزگر قادر به ایجاد ترکیبات شیمیایی خاص و باارزش از طریق حذف، اضافه نمودن و یا اصلاح استخلاف های عاملی در جایگاه های مشخص از سوبستراهای به‌کار گرفته به‌عنوان پیش ساز می باشد (۱و ۲). زی تبدیل میکروبی ال- تیروزین به ال- دوپا، فرآیندی همسو و متناسب با محیط زیست بوده (شیمی سبز) و ال- دوپای تولید شده بوسیله این فرآیندها جزء ترکیبات طبیعی طبقه بندی می شوند و بنابراین در بازارهای دارویی با استقبال بالایی از سوی مصرف کنندگان مواجه می شود (۱۴ و ۱۶ و ۱۸). با توجه به اینکه بسیاری از داروهای سنتزی موجود در بازار دارویی بصورت راسمیک هستند و از آنجایی که انانتیومرهای نوری این داروهای کایرال از نظر خواص فارماکوسنتیکی و فارماکودینامیکی با هم تفاوت دارند بطوری که یکی از انانتیومرها دارای یک اثر زیستی خاص و انانتیومر دیگر دارای همان اثر، اثری کمتر، اثری متضاد و یا بی اثر دارد و نظر به اینکه در فرآیند زیست تبدیل میکروبی تنها یکی از ایزومرهای مورد نظر بصورت خالص سنتز می شود، بنابراین به کمک فرآیند زیست تبدیل میکروبی ال- تیرزوین می توان به تک ایزومر ال- دوپا (انانتیومر دارای اثر دارویی) دست یافت (۴ و ۱۵). زی تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا در طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها متعلق به جنس‌های قارچی و باکتریایی شامل *Aspergillus* (۴)، *Actinomycetes*(۱۵)، *Yarrowia* (۳)، *Brevundimonas* (۱۷)، *Vibrio* (۲۲)، *Pseudomonas* (۲۳) و *Bacillus* (۱۶) گزارش شده است. باکتریهای نمک دوست با توجه به داشتن ویژگی‌هایی مانند سریع الرشد بودن، نیاز غذایی کم و توانایی استفاده از انواع ماکروملکول‌ها به‌عنوان تنها منبع دریافت انرژی و همچنین عدم ایجاد آلودگی برای استفاده در فرآیندهای صنعتی مناسب هستند (۱۰). علیرغم قابلیت بالای باکتری‌های نمک دوست در تولید انواع آنزیم‌های هیدرولیتیک که باعث ارزشمندی این میکرواورگانیسم‌ها در فرآیندهای مختلفی از جمله پاکسازی زیستی (۱۲) و زی تبدیلی شده (۶)، با این وجود تا به امروز، مطالعه‌ای در ارتباط با کاربرد باکتری‌های نمک دوست در زی تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا صورت نگرفته است. بنابراین، در این پژوهش، برای نخستین بار زی تبدیلی میکروبی ال- تیروزین به ال- دوپا با استفاده از سویه‌های باکتری نمک دوست نسبی به-عنوان کاتالیست‌های سبز ایمن مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روشها

مواد شیمیایی و محیط های کشت: ال- تیروزین و ال- دوپای بکار گرفته شده در واکنش‌های زی تبدیلی از شرکت سیگماخریداری شد. محیط کشت لوریا برتانی (۱۰ گرم در لیتر تریپتون، ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر و ۵ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم) از سیگما خریداری شد. نمک سولفات مس از شرکت دیفکو خریداری شد. نمک‌های کلرید سدیم، کلرید منیزیم، سولفات منیزیم، کلرید کلسیم، کلرید پتاسیم، بیکربنات سدیم و برمید سدیم از شرکت مرک خریداری شد. گلوکز، گلیسرول، عصاره مخمر، پپتون، تریپتون و کلرید آمونیوم از هایمدیا خریداری شد. مواد و وسایل مورد نیاز برای انجام واکنش PCR و همچنین پرایمرهای رفت (fd1) و برگشت (rp2) جهت شناسایی سویه های باکتری از شرکت فزاپژوه تهیه شد.

نمونه برداری و تکنیک غنی سازی: نمونه برداری بصورت تصادفی از عمق ۲۰ سانتی متری و در حجم های ۱۰۰ میلی لیتری (ظروف درب دار استریل) از نقاط مختلف دریاچه حوض سلطان قم، دریاچه بختگان فارس، سواحل دریای خزر و خلیج فارس انجام گرفت. این

نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا هنگام استفاده نگهداری شدند. برای غنی سازی باکتری‌های نمک دوست نسبی در محیط حاوی ال- تیروزین، ۲۵ میلی لیتر از نمونه‌های آب شور جمع آوری شده به لوله‌های فالکون استریل منتقل و در دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی را دور ریخته و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از مایع تحتانی به‌عنوان مایه تلقیح به محیط‌های کشت غنی کننده لوریا برتانی آگار حاوی ۱۰۰ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم منتقل شد. به محیط‌های کشت مذکور اسید آمینه ال- تیروزین در غلظت نهایی ۲/۵ گرم در لیتر، پس از استریل شدن توسط فیلترهای سرسرنگی ۰/۲۵ میکرونی، افزوده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. سویه‌های جدا شده به - صورت کلنی های تک، به محیط‌های لوریا برتانی آگار حاوی ۱۰۰ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم، به صورت کشت خطی انتقال داده شدند. سویه‌های خالص شده به محیط‌های اسلنت دار جهت آزمایشات بعدی انتقال داده شدند (۵).

جداسازی سویه‌های باکتری نمک دوست نسبی با پتانسیل تجزیه کنندگی ال- تیروزین: برای جداسازی سویه‌های باکتری نمک دوست نسبی با قابلیت تجزیه کنندگی ال- تیروزین، از محیط پایه نمکی پیشنهادی توسط Nieto و همکاران (۱۱)، با اندکی تغییرات، با ترکیب زیر استفاده شد (گرم در لیتر): کلرید سدیم ۱۰۰، کلرید کلسیم ۰/۳۶، کلرید پتاسیم ۲، کلرید منیزیم ۷، سولفات منیزیم هفت آبه ۹/۶، بیکربنات سدیم ۰/۰۶، برمید سدیم ۰/۰۲۶ و آگار ۲۰ . به محیط مذکور به میزان ۲/۵ گرم در لیتر ال- تیروزین به‌عنوان تنها منبع کربن و ازت اضافه شد. محیط- های کشت مذکور به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند.

بررسی تولید ال دوپا از ال تیروزین تحت واکنش سلول‌های رویشی: سویه‌های باکتریایی با قابلیت تجزیه کنندگی ال- تیروزین در محیط آبگوشتی لوریا برتانی حاوی ۱۰۰ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس اسید آمینه ال- تیروزین، پس از فیلتراسیون از طریق پالایه های غشایی میلی پور۰/۲۲ میکرونی، در غلظت نهایی ۲/۵ گرم در لیتر به محیط افزوده شدند. پس از طی ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری اضافی، ابتدا کل مایع رویی از توده سلولی با استفاده از سانتریفیوژ کردن (۵۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه) جدا گردید. در ادامه، میزان ال تیروزین مصرف شده و ال دوپای تولید شده در مخلوط واکنش زی تبدیلی، از روش اسپکتروفتومتری براساس روش پیشنهادی Rani و همکاران (۱۳) استفاده شد. برای تعیین کمی میزان تیروزین مصرف شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی، میزان ۱ میلی لیتر از معرف سولفات مرکوریک ۲/۵ میلی مولار به ۱ میلی لیتر سوپرناتانت کشت واکنش زی تبدیلی اضافه شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم در حال جوش گرماگذاری شدند. سپس نمونه ها از حمام آب گرم خارج شده و پس از سرد شدن در دمای آزمایشگاه، ۱ میلی لیتر نیتریت سدیم و ۱ میلی لیتر مولیبدات سدیم اضافه شد. سپس جذب محلول کلوئیدی (زرد رنگ) تشکیل شده در طول موج ۴۴۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (Analytik Jena's spectrophotometer SPECORD 210.Germany) قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد، ابتدا غلظت های مختلفی از محلول‌های استاندارد ال- تیروزین تهیه شده که شامل ۱۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بود توسط دستگاه خوانده شده و سپس به کمک رسم منحنی کالیبراسیون و تهیه معادله خط منحنی استاندارد ($y= 0.0133x- 0.0824, R^2= 0.9823$)، غلظت ال- تیروزین موجود در مخلوط واکنش زی تبدیلی تعیین گردید. در ادامه و با هدف تعیین میزان ال- دوپای تشکیل شده در واکنش زی تبدیلی، میزان ۱ میلی لیتر از هر یک از معرف‌های زیر شامل اسید کلریدریک ۲ مولار، مولیبدات

سدیم ۱۵ درصد وزنی/حجمی، نیتریت سدیم ۱۵ درصد وزنی/حجمی و هیدروکسید سدیم ۲ مولار به ۱ میلی لیتر سوپرناتانت اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه گرماگذاری شدند. جذب محلول کلوئیدی (قرمز پرتغالی) تشکیل شده در طول موج ۴۹۶ نانومتر قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد، ابتدا غلظت‌های مختلفی از محلول‌های استاندارد ال- دوپا تهیه شده که شامل ۱۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بود توسط دستگاه خوانده شده و سپس به کمک رسم منحنی کالیبراسیون و تهیه معادله خط منحنی استاندارد ($y= 0.0185x- 0.148, R^2= 0.9914$)، غلظت ال- دوپای موجود در مخلوط واکنش زی تبدیلی تعیین گردید.

شناسایی ملکولی سویه باکتری SL-7: استخراج DNA ژنومی سویه SL-7 به روش فنل- کلروفرم روی سوسپانسیون حاصل از کشت خالص ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت مایع لوریا برتانی حاوی ۱۰۰ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم انجام شد (۸). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش، متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر ماسترمیکس (بافر PCR، MgCl2، dNTPs، آنزیم Taq-polymerase)، ۱ میکرولیتر پرایمرهای بالادست (fd1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و پایین دست (rp2: ACGGCTACCTTGTTACGACTT) (۲۱) با غلظت تقریبی ۱۰ میکرومولار، ۱ میکرولیتر DNA الگو (غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۹/۵ میکرولیتر آب PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل C1000 کمپانی Bio-Rad کشور آلمان) انجام گرفت. برنامه تکثیری با واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه سپس ۳۰ سیکل به صورت واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، چسبیدن پرایمر به DNA ژنومی در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR به منظور تعیین توالی به شرکت زیست فناوران ارسال شد. نتایج مربوط به تعیین توالی های رفت و برگشت پس از ویرایش توسط نرم افزار BioEdit به صورت یک توالی کامل تهیه شد. سپس توالی های بدست آمده توسط نرم افزار BLAST موجود در بانک ژنی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) با باکتری‌های موجود مقایسه شد و نزدیک ترین سویه‌های باکتری براساس توالی 16S rDNA و به کمک ترسیم درخت فیلوژنیک با استفاده از نرم افزار MEGA. 6 تعیین شد (۱۹).

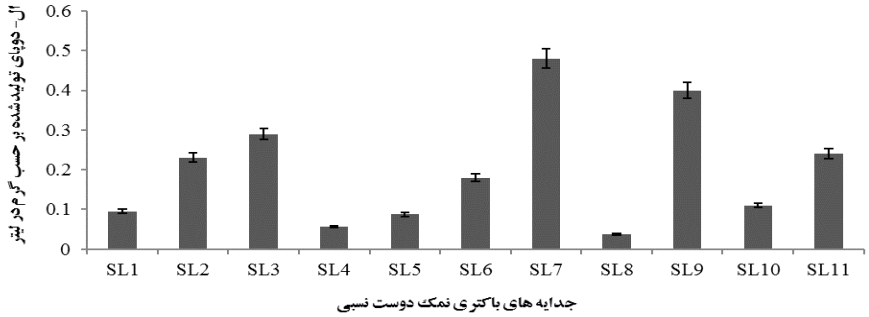
بهینه سازی تولید ال-دوپا از ال-تیروزین در سویه SL-7 تحت سلول‌های در حال استراحت: بعد از شناسایی فنوتیپی و مولکولی سویه جدا شده، به منظور بهبود راندمان تولید ال- دوپا، اثر چندین پارامتر در مخلوط واکنش زی تبدیلی تحت استراتژی سلول در حال استراحت مورد بررسی و بهینه سازی قرار گرفت. آزمایشات در داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات نمکی (K_2HPO_4/KH_2PO_4, 100 mM و NaCl 100g/l; pH 7) و غلظت های مختلف ال- تیروزین (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ گرم بر لیتر)، غلظت‌های مختلف از توده سلولی (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۲/۵ گرم بر لیتر بر حسب وزن خشک)، غلظت‌های مختلف یون مس (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴ و ۰/۰۵ گرم در لیتر) و همچنین اثر منابع کربن و ازتی معدنی و آلی مختلف شامل گلوکز، گلیسرول، پپتون، تریپتون، کلرید آمونیوم و عصاره مخمر در غلظت های نهایی ۱ گرم در لیتر، تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت انجام شد. همه آزمایشات زی‌تبدیلی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpmدر یک دوره گرماگذاری ۲۴ ساعت صورت گرفت. به منظور تهیه سلول‌های در حال استراحت باکتری نمک دوست نسبی جداسازی شده و استفاده از آنها به‌عنوان بیوکاتالیزگر در آزمایشات زی‌تبدیلی، سلول‌های باکتری در محیط مایع LB حاوی ۱۰۰ گرم در لیتر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و

دور شیکر ۱۵۰ rpm به مدت ۲۸ ساعت (تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی) کشت داده شدند. سپس توده سلولی به کمک سانتریفیوژ برداشت و پس از شستشوی سلول‌ها در بافر فسفات، از سلول‌های برداشت شده به‌عنوان کاتالیزگر در آزمایشات زی‌تبدیلی استفاده شد (۵).

نتایج

غنی سازی و جداسازی سویه های باکتری نمک دوست

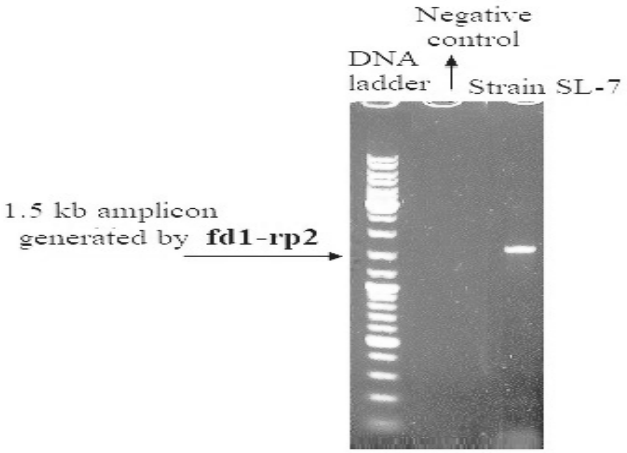
نسبی تجزیه کننده ال- تیروزین با قابلیت زی تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا: پس از انجام نمونه گیری از آب‌های شور مناطق مختلف و غنی سازی در محیط حاوی ال- تیروزین، حدود ۴۰ سویه باکتری نمک دوست نسبی جداسازی شدند که در میان آنها تنها ۱۱ سویه توانایی در مصرف ال- تیروزین به‌عنوان تنها منبع کربن و ازت در محیط پایه نمکی از خود نشان دادند.



شکل ۱- تولید زیستی ال- دوپا از ال- تیروزین تحت سلول‌های رویشی سویه‌های باکتری نمک دوست نسبی تجزیه کننده ال- تیروزین. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار±۱ معرف انحراف معیار است.

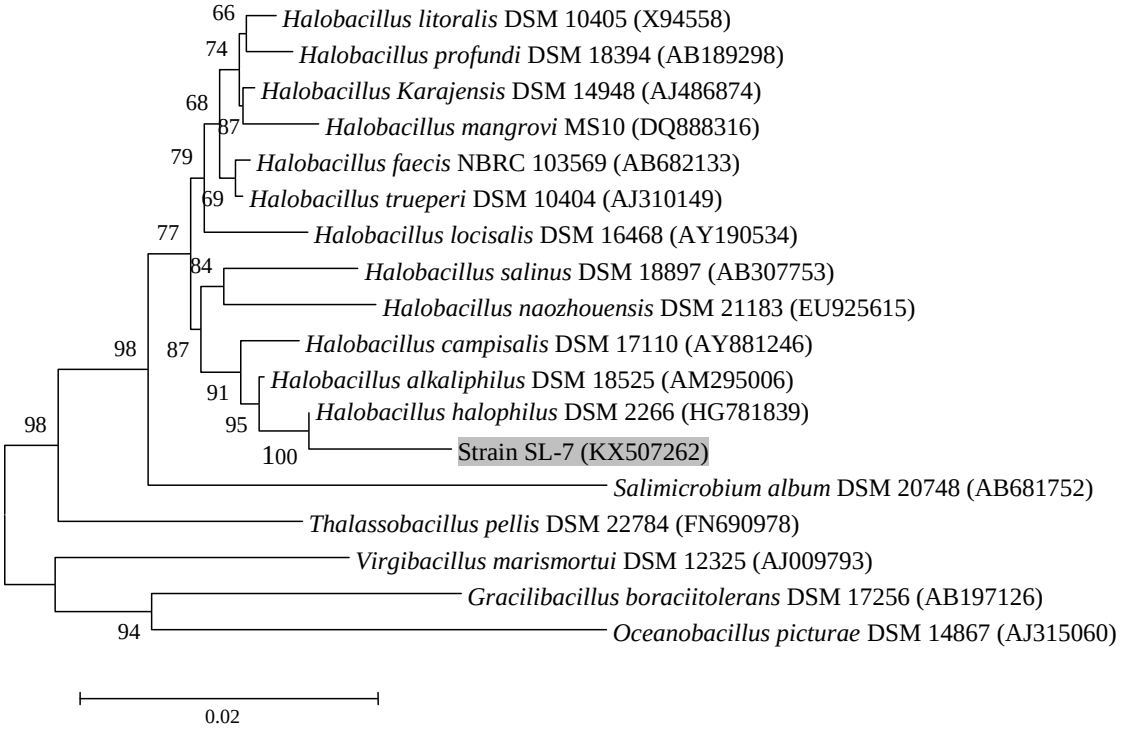
در ادامه و با هدف انتخاب سویه برتر، سویه‌های مذکور جهت آزمایشات زی تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا تحت شرایط سلول‌های رویشی انتخاب شدند. ۱۱ سویه باکتری با قابلیت استفاده از ال- تیروزین به‌عنوان تنها منبع کربن و ازت، در محیط لوریا برتانی حاوی ۱۰۰ گرم در لیتر نمک کلرید سدیم به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سوبسترای ال- تیروزین در غلظت نهایی ۲/۵ گرم در لیتر به محیط زی‌تبدیلی افزوده شد. بعد از ۲۴ ساعت واکنش تحت سلول های رویشی، از آنالیز اسپکتروفتومتری استفاده شد. براساس نتایج بدست آمده، از میان سویه‌های باکتری مذکور، سلول‌های رویشی سویه SL-7 بالاترین میزان تولید ال-دوپا (۰/۴۸گرم در لیتر) را نشان داد (شکل ۱). سویه SL-7 به‌عنوان سویه برتر مورد شناسایی فنوتیپی و مولکولی جهت آزمایشات زی‌تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا قرار گرفت.

شناسایی فنوتیپی و ملکولی سویه SL-7: سویه SL-7 که براساس آنالیز کمی اسپکتروفتومتری دارای بیشترین میزان ال- دوپای تشکیل شده در واکنش زی‌تبدیلی بود را انتخاب و براساس ویژگی‌های ریخت شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مورد شناسایی قرار گرفت. سویه SL7 یک باکتری میله ای شکل گرم مثبت، تولید کننده اسپور، کاتالاز و اکسیداز مثبت، متحرک، شدیدا هوازی و دارای قابلیت تحمل پذیری نمک کلرید سدیم بین۲۰ تا ۱۲۰ گرم در لیتر می باشد. این سویه از یک نمونه آب شور جمع آوری شده از دریاچه حوض سلطان قم جداسازی شده بود. جهت شناسایی ملکولی سویه SL-7، ابتدا DNA ژنومی استخراج و سپس ژن کد کننده نواحی ۱۶S rDNAاز طریق پرایمرهای یونیورسال fd1 و rp2 مورد واکنش PCR قرار گرفت (شکل ۲). همانگونه که در شکل قابل مشاهده می‌باشد محصول PCR مناسب در ناحیه pb ۱۵۰۰ نمایان شده که بیانگر خلوص DNA مورد استفاده جهت تعیین توالی می باشد.



شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR سویه SL-7

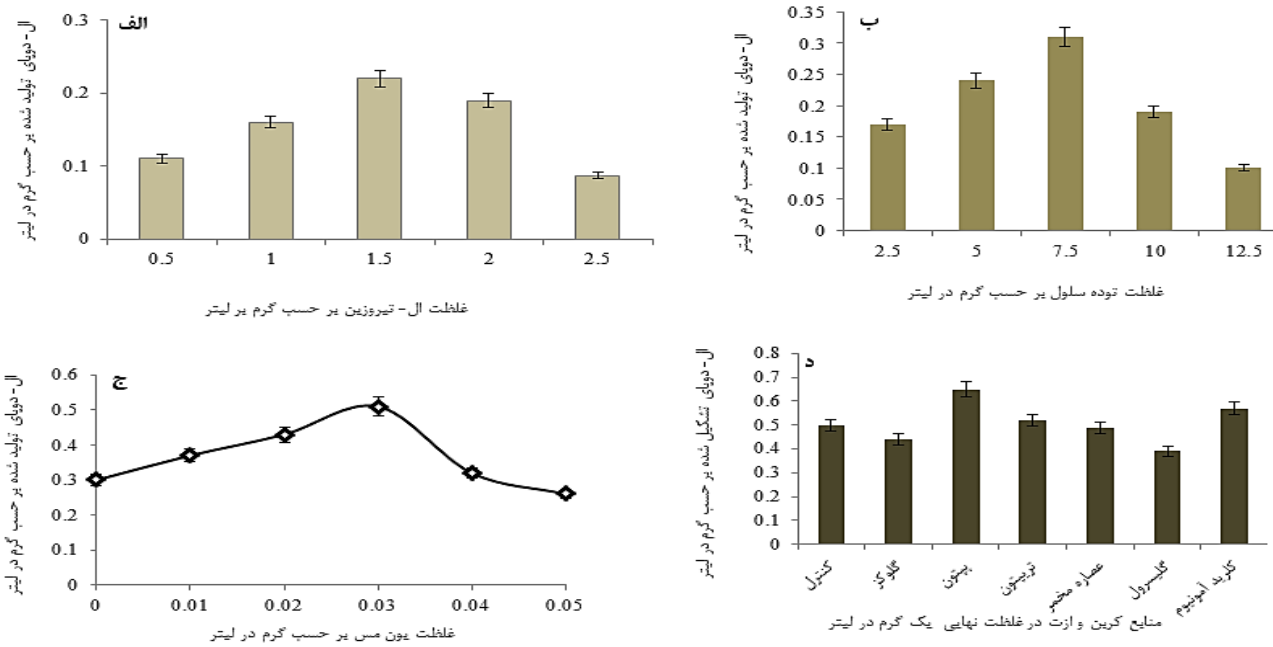
پس از مشخص شدن توالی ژن ۱۶S rDNA سویه SL-7، آنرا در برنامه کامپیوتری بلاست قرار داده و سپس با استفاده از سایت NCBI باکتری مورد نظر شناسایی شد. براساس نتایج حاصل از بلاست این سویه دارای بیش از ۹۹ درصد مشابهت با سویه های متعلق به *Halobacillus halophilus* می باشد. بعد از تعیین توالی ژن ۱۶S rDNA، این ژن در بانک ژنی با شماره دسترسی KX507262 ثبت شد. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنیک تائید کرد که سویه‌ی مورد نظر به جنس *Halobacillus* تعلق دارد و علاوه بر این احتمالا می تواند به عنوان سویه‌ی از *Halobacillus halophilus* طبقه بندی شود.



شکل ۳- درخت فیلوژنی سویه‌ی SL-7 و دیگر اعضای جنس *Halobacillus* بر اساس ژن تکتیریافته‌ی ۱۶S rDNA. شماره دسترسی سویه های ثبت شده در پرانتز آورده شده است.

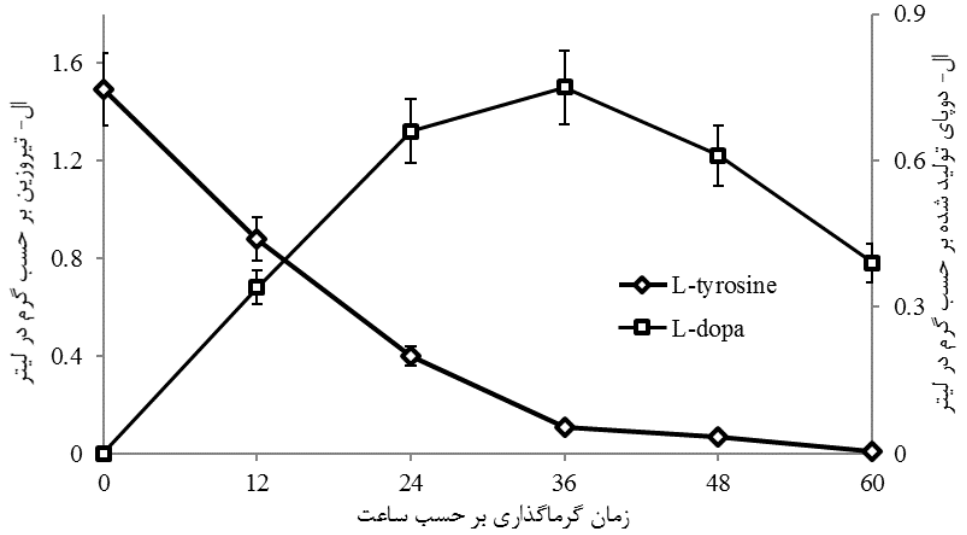
در درخت فیلوژنی که بر اساس آنالیزهای توالی ژن ۱۶S rDNA به روش neighbor-joining بدست آمده است، موقعیت سویه‌ی SL-7 در بین گونه‌های جنس *Halobacillus* آمده است (شکل ۳).

تاثیر پارامترهای مختلف بر روی زی‌تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا تحت استراتژی سلول در حال استراحت: به منظور بهینه سازی پارامترهای موثر برروی زی‌تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا در باکتری*Halobacillus* sp. SL-7، اثرات چندین پارامتر شامل غلظت اولیه ال- تیروزین، غلظت توده سلولی (بر حسب وزن خشک سلول)، غلظت یون مس و اثرات منابع کربن و ازت مختلف در محیط بافر نمکی فسفات تحت شرایط سلول در حال استراحت، بوسیله روش تک فاکتوری مورد بررسی قرار گرفت (رجوع شود به بخش مواد و روشها). در تمامی موارد ال-دوپای تشکیل شده در مخلوط واکنش زی‌تبدیلی پس از گذشت ۲۴ ساعت گرماگذاری مورد سنجش قرار گرفته است (شکل ۴ قسمت های الف تا د). همانگونه که در شکل مشاهده می شود، بیشترین میزان تولید ال-دوپا در غلظت ۱/۵ گرم در لیتر ال- تیروزین، غلظت ۷/۵ گرم در لیتر توده سلولی، غلظت ۰/۰۳ گرم در لیتر یون مس مشاهده شد. از بین منابع کربنی و ازتی استفاده شده بیشترین میزان تولید ال- دوپا در حضور پپتون مشاهده شد.



شکل ۴- اثرات پارامترهای مختلف بر روی تولید ال-دوپا از ال-تیروزین در باکتری*Halobacillus* sp. SL-7 در محیط بافر نمکی فسفات تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار±۱ معرف انحراف معیار است.

در ادامه و با هدف بهبود واکنش زی‌تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا، اثرات دوره ی گرماگذاری تحت شرایط بهینه شده تک عاملی بدست آمده در مخلوط واکنش زی‌تبدیلی مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۵). براساس نتایج بدست آمده، تحت شرایط بهینه شده بالا، ۰/۷۵گرم در لیتر ال- دوپا از ۱/۵ گرم در لیتر ال- تیروزین پس از ۳۶ ساعت واکنش زی‌تبدیلی تولید شده است. راندمان مولی تولید ال- دوپا از ال- تیروزین در فرآیند فوق ۴۶/۲ درصد بوده است.



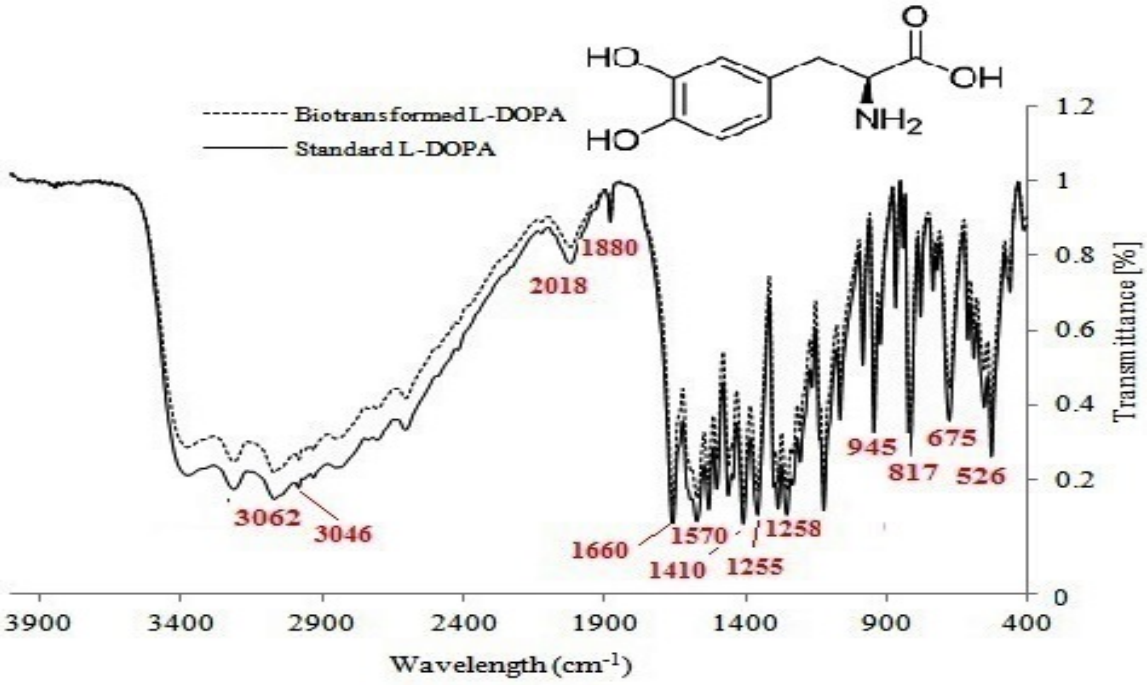
شکل ۵- زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا بوسیله سلولهای در حال استراحت *Halobacillus* sp. SL-7 تحت شرایط بهینه شده توسط روش تک فاکتوری. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش و بار۱± معرف انحراف معیار است.

در نهایت ال- دوپای تولید شده در مخلوط واکنش های زی‌تبدیلی، پس از استخراج و تخلیص از طریق کروماتوگرافی لایه نازک، مورد آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) قرار گرفت. همانگونه که در شکل (۶) مشاهده می شود، با بررسی نواحی جذبی گروه-های عاملی ال- دوپای سنتزی در واکنش زی‌تبدیلی و مقایسه آن با طیف‌های استاندارد می توان پی برد که این اعداد به خوبی با جذب گروه‌های عاملی متشابه در ال-دوپا استاندارد مطابقت دارد.

بحث

ال- دوپا یکی از مشتقات آمینواسیدهاست که بیشترین پتانسیل دارویی در مقابله با بیماری پارکینسون را دارا می باشد. یکی از دلایل بیماری پارکینسون پایین آمدن سطح دوپامین می‌باشد. بااین‌حال استفاده مستقیم از دوپامین مفید نبوده چراکه دوپامین قادر به عبور از سد خونی- مغزی نمی‌باشد اما الدوپا به‌عنوان پیش ساز دوپامین می‌تواند از این سد عبور کند و به دوپامین تبدیل شود و به‌این‌ترتیب به بهبود بیماری پارکینسون کمک کند (۱۶). چندین روش برای تولید الدوپا وجود دارد، یکی از این روش‌ها سنتز شیمیایی ست. سنتز شیمیایی الدوپا شامل استفاده از مواد شیمیایی سمی و کاتالیزگرهای گران قیمت و تولید تحت شرایط سخت از نظر دما و pH می‌باشد که حاصل آن تولید مخلوط راسمیک L و D است که غیرفعال می‌باشند و جداسازی انانتیومرهای تولیدی به‌صورت ال- دوپای خالص بسیار سخت و زمان بر بوده که همین امر هزینه‌های پیش‌بینی‌شده را دو برابر می‌کند (۱۳). این در حال است که در تولید میکروبی آن، فقط یکی از ایزومرهای موردنظر به‌صورت خالص تولید می‌شود. این امر می‌تواند از به وجود آمدن مواد سمی یا مخلوط راسمیک جلوگیری کند و نتیجه بهتری را از دیدگاه خلوص ماده در برداشته باشد. روش دیگری که برای تولید ال- دوپا استفاده می شود شامل استخراج مستقیم از منابع گیاهی از جمله بذرها و غلاف باقلای سبز (*Vicia faba*) و لوبیای مخملی(*Mucuna pruriens*) است که علیرغم اینکه فرآورده حاصل در گروه محصولات طبیعی طبقه بندی می شود اما با توجه به کاربردهای گسترده ال- دوپا و افزایش روزافزون مصرف فرآورده های طبیعی و از

آنجایی که منابع گیاهی محدود بوده و به تنهایی قادر به تامین بازارهای جهانی نیستند، بنابراین در دهه های اخیر تلاش های گسترده ای جهت دستیابی به انانتیومرهای خالص ال- دوپا از ال- تیروزین از طریق های فرآیندهای زی تبدیلی صورت گرفته است (۱۴ و ۱۸).



شکل ۶- طیف‌های FTIR گرفته شده از ال- دوپای سنتزی و ال- دوپای استاندارد

Rani و همکاران (۱۳) از گیاه *Portulaca grandiflora* در تبدیل زیستی ال- تیروزین به ال- دوپا استفاده کردند و نتایج نشان داد که ماکزیمم تولید ال- دوپا (۴۸/۸ میلی گرم در لیتر) بعد از یک ساعت واکنش زی‌تبدیلی در محیط کشت عاری از ویتامین، اسیدآمینه و عناصر کم‌مصرف حاصل شد. استفاده از دو ماده ۲ و ۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید (در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر) و بنزیل آمینو پورین (در غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر) و هنگامی‌که غلظت سولفات مس تا ۰/۹۵ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت، نرخ زی‌تبدیلی دو برابر شد. Surwase و Jadhav با بررسی تولید ال- دوپا از ال- تیروزین در سویه JPJ *Bacillus* sp. گزارش دادند که با استفاده از ۰/۵ گرم در لیتر ال- تیروزین موفق به تولید ۰/۴۹۷ گرم در لیتر ال- دوپا با راندمان مولی بیش از ۹۹ درصد تحت شرایط بهینه شده شدند (۱۶). Raval و همکاران (۱۴) نیز بر روی تولید ال- دوپا از ال- تیروزین به‌وسیله آنزیم تیروزیناز، استخراجی از سویه قارچی *Penicillium jensenii*، کارکردند و به نتایج مشابهی دست یافتند. در مطالعه صورت گرفته توسط Surwase و همکاران (۱۷)، زی تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا را توسط سویه باکتری *Brevundimonas* sp. SGJ مورد بررسی قرار دادند که براساس نتایج بدست آمده، تحت شرایط بهینه شده واکنش زی‌تبدیلی (غلظت ال- تیروزین ۴ گرم در لیتر، غلظت توده سلول ۲ گرم در لیتر، غلظت یون مس ۰/۰۴ گرم در لیتر، غلظت اسید آسکوربیک ۰/۰۲ گرم در لیتر و pH برابر ۸) بیش از ۳/۸ گرم در لیتر ال- دوپا با راندمان مولی بیش

از ۹۵ درصد پس از ۱۸ ساعت واکنش بدست آمد. در مطالعات مشابه صورت گرفته، تولید زیستی ال- دوپا از ال- تیروزین در سویه های قارچی *Aspergillus oryzae* IAM2625 (۹) و *Aspergillus niger* (۴) گزارش شده که براساس نتایج بدست آمده بیشترین میزان ال- دوپای تولید شده به ترتیب ۰/۸۸ و ۰/۳۶ گرم در لیتر بدست آمده است. اگرچه گزارشات متعددی در ارتباط با زی‌تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا در سویه های متعدد قارچی و باکتریایی صورت گرفته اما با این حال، تا به امروز پتانسیل باکتری های نمک دوست نسبی در زی‌تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا بررسی نشده است. میکرواورگانیسم‌های نمک دوست از نظر فیلوژنیک گروه متنوعی از باکتریها هستند که از لحاظ سازگاری با درصدهای پایین نمک ها می باشند، اما این توانایی را دارند که تغییرات سریع در جهت تطبیق با غلظت های بالای نمک داشته باشند (۲۰). از آنجا که میکرواورگانیسم های نمک دوست بطور طبیعی به غلظت-های بالای آنیونی و کاتیونی برای رشد نیاز دارند و دارای تحمل پذیری بالا نسبت به فلزات سمی، اکسی آنیونهای سمی و همچنین قابلیت آنزیمی بالایی دارند بنابراین می توانند گزینه مناسبی برای مطالعات زی‌تبدیلی باشند. هدف از مطالعه اخیر جداسازی و شناسایی باکتریهای نمک دوست با پتانسیل تبدیل کنندگی ال- تیروزین به ال- دوپا و بررسی امکان استفاده از این باکتری‌ها به‌عنوان زیست-کاتالیزگر برای تهیه متابولیت باارزش ال- دوپا بود. در این راستا، در طی یک برنامه غربالگری وسیع با هدف جداسازی انواع سویه‌های باکتری نمک دوست نسبی با قابلیت تبدیل کنندگی ال- تیروزین، ۴۰ سویه باکتری از نمونه‌های آب‌های شور جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران جدا شد. پتانسیل سویه‌های مذکور برای مصرف ال-تیروزین به‌عنوان تنها منبع کربن و ازت مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده سلول‌های رویشی سویه باکتری SL-7 (جدا شده از یک نمونه آب جمع آوری شده از دریاچه حوض سلطان قم)، به‌عنوان سویه برتر در تولید ال-دوپا مورد شناسایی فنوتیپی و فیلوژنتیکی قرار گرفت. سویه SL-7 دارای مشابهت بیش از ۹۹ درصدی با گونه های ثبت شده *Halobacillus halophilus* بود. در ادامه این تحقیق با هدف افزایش راندمان واکنش زی‌تبدیلی و جلوگیری از تجزیه بیشتر متابولیت‌های تولیدی (ال-دوپا) میزان ال- دوپای تولید شده تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت در سویه مذکور سنجش شد. محققان زیادی از این استراتژی برای بهبود فرآیندهای زی‌تبدیلی استفاده نموده اند (۲ و ۶). مزایای استفاده از استراتژی سلول‌های در حال استراحت عبارت است از: جلوگیری از تکثیر بیومس سلولی، جداسازی آسانتر محصول تولیدی، انجام فرآیند زی‌تبدیلی تحت شرایط غیراستریل، کاهش زمان زی‌تبدیلی و در نتیجه افزایش راندمان و تنظیم بیومس سلولی ورودی. با توجه به مزایای استفاده از سلول‌های در حال استراحت، مطالعات زی‌تبدیلی ال- تیروزین به ال-دوپا تحت سلول‌های در حال استراحت *Halobacillus* sp. SL-7 بوسیله روش بهینه سازی تک عاملی بررسی شد (شکل ۴). آنالیز نتایج حاصل از تاثیر فاکتورهای مختلف بر روی تولید ال- دوپا از طریق بهینه سازی تک فاکتوری بصورت زیر خلاصه شده است: یک افزایش تدریجی در تولید الدوپا در غلظت ۲/۵ تا ۷/۵ گرم در لیتر بیومس سلول، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در غلظت ۱/۵ گرم در لیتر ال-تیروزین تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی گراد، pH برابر ۷ و دور شیکر rpm ۱۵۰وجود دارد. حداکثر تولید الدوپا ۰/۳۱ گرم در لیتر بود که در غلظت ۷/۵ گرم در لیتر بیومس سلول به دست آمد. ازاین‌رو در مطالعات اخیر برای تولید به‌صرفه و اقتصادی الدوپا از غلظت ۷/۵ گرم در لیتر بیومس سلول استفاده شد. بااین‌حال در غلظت‌های بالاتر از ۷/۵ گرم در لیتر به دلیل احتمالا کاهش در انتقال اکسیژن و یا تجزیه سریع تر سوبسترای اولیه، راندمان تولید ال- دوپا کاهش یافته است (۷). تأثیر غلظت‌های متفاوت یون مس در تولید الدوپا در محیط بافرنمکی فسفات حاوی ۱/۵ گرم در لیتر ال-

تیروزین، غلظت بهینه ۷/۵ گرم در لیتر بیومس سلول، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، pH برابر ۷ و دور شیکر ۱۵۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت موردمطالعه قرار گرفت. در غلظت‌های پایین میزان تولید الدوپا کم است و در غلظت‌های بالا مقدار ال- دوپا افزایش پیدا می‌کند و بهترین غلظت یون مس برای تولید بهینه ال- دوپا در غلظت ۰/۰۳گرم در لیتر بود که نرخ تولید ال- دوپا برابر ۰/۵۱ گرم در لیتر است. در ارتباط با تاثیر بالای یون مس می توان این فرضیه را مطرح نمود که یون مس به‌عنوان کوفاکتور باعث افزایش در فعالیت آنزیم‌های مسئول زی‌تبدیلی ال- تیروزین (آنزیم تیروزیناز) شده است (۴ و ۱۴). با توجه به اینکه انتخاب منابع کربن و ازت مناسب به‌عنوان سوبستراهای کمکی می تواند در زی‌تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا مهم باشد، اثر منابع کربن و ازت مختلف بر روی نرخ تولید ال- دوپا تحت شرایط بهینه شده بررسی شد. براساس نتایج بدست آمده حداکثر مقدار الدوپا (۰/۶۵ گرم در لیتر) در حضور پپتون بدست آمد. در ادامه و با هدف بهبود زی تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا، اثرات دوره‌ی گرماگذاری تحت شرایط بهینه شده در مخلوط واکنش زی تبدیلی مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۵). یک افزایش تدریجی در روند تولید الدوپا از شروع واکنش زی تبدیلی تا ساعت ۳۶ ام وجود دارد که حداکثر تولید ال- دوپا (۰/۷۵ گرم در لیتر) در ساعت ۳۶ ام مشاهده شد اما بعد از ساعت ۳۶ ام نرخ تبدیل کاهش می‌یابد که این کاهش در تولید ال- دوپا همراه با افزایش زمان گرماگذاری ممکن است ناشی از رشد سریع باکتری و تجزیه بیشتر محصول ال- دوپای تشکیل شده در مخلوط واکنش زی‌تبدیلی باشد. نتایج نشان داد که بهینه سازی تک عاملی ابزاری قدرتمند برای بهینه‌سازی و بهبود فرآیند تولید زیستی ال- دوپا ادر سویه باکتریایی موردمطالعه است.

نتیجه‌گیری

اگرچه تا به امروز گزارش‌هایی از کاربرد سویه‌های متعدد باکتریایی و قارچی در زی‌تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا منتشر شده است، با این حال، مطالعه پیش رو، نخستین گزارش در مورد تبدیل زیستی ال- تیروزین به ال- دوپا بوسیله باکتری‌های نمک دوست نسبی است. بنابراین باکتری بومی غربال گری شده *Halobacillus* sp. SL-7 را می توان به‌عنوان یک زیست کاتالیزگر پاک در زی‌تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا معرفی کرد. استفاده عملی از باکتری یاد شده در مقیاس‌های بالاتر (Scale up)، نیازمند انجام فرآیندهای بهینه سازی بیشتر و همچنین شناسایی، تعیین ویژگی آنزیمی و ساز و کار دخیل در زی‌تبدیلی ال- تیروزین به ال- دوپا توسط سویه‌ی باکتری مذکور است.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد بوده که با حمایت دانشگاه کردستان به انجام رسیده است. نویسندگان این مقاله از تمام کسانی که در اجرای این مطالعه همکاری نموده اند، کمال قدردانی و سپاسگزاری را دارد.

منابع

۱- آشنگرف، م و نحوی، ا. ۱۳۹۳. تولید زیستی وانیلین طبیعی از سوبستراهای فنیل پروپانوئیدی بوسیله زیست تبدیلی با استفاده از سلول های میکروبی. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۳، صفحات ۳۱۶-۳۳۴.

۲- آشنگرف، م و نحوی، ا. ۱۳۹۳. استفاده از سلولهای در حال استراحت *Halomonas salina* HSL5 بعنوان زیست واکنشگر برای تولید بیولوژیک اسید وانیلیک. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۱، صفحات ۱-۱۳.

3. Ali, S. Shultz. J.L. and Qadeer, M.A. (2007) High performance microbiological transformation of L-tyrosine to L-dopa by *Yarrowia lipolytica* NRRL-143. BMC Biotechnology 7: 50.

4. Ali, S. and Haq, I. (2010) Production of 3, 4-dihydroxy L-phenylalanine by a newly isolated *Aspergillus niger* and parameter significance

analysis by Plackett-Burman design. BMC Biotechnology 10: 86.

5. Ashengroph, M. Nahvi, I. Zarkesh-Esfahani, H. and Momenbeik, F. (2011) *Candida galli* strain PGO6: a novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanillic acid. Current Microbiology 62: 990–998.

6. Ashengroph, M. Nahvi, I. Zarkesh-Esfahani, H. and Momenbeik, F. (2012) Conversion of isoeugenol to vanillin by *Psychrobacter* sp. strain CSW4. Applied and Biochemistry and Biotechnology 166:1–12.

7. Ashengroph, M. (2017) A novel strain of *Aureobasidium* sp. TeO12 for theophylline production from caffeine. 3 Biotech 7: 176.

8. Fadl, A.A. Nguyen, A.V. and Khan, M.I. (1995) Analysis of *Salmonella enteritidis* isolates by arbitrarily primed PCR. Journal of Clinical Microbiology 33: 987-989.

9. Haneda, K. Watanabe, S. and Takeda, I. (1971) Synthesis of 3, 4-dihydroxyphenyl L-alanine from L-tyrosine by microorganisms. Applied Microbiology 22: 721-722.

10. Margesin, R. and Schinner, F. (2001) Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles 5: 73–83.

11. Nieto, J.J. Fernandez-Castillo, R. Marquez, M.C. Ventosa, A. Quesada, E. and Ruiz-Berraquero, F. (1989) Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. Applied and Environmental Microbiology 55: 2385–2390.

12. Raddadi, N. Cherif, A. Daffonchio, D. Neifar, M. and Fava, F. (2015) Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. Applied Microbiology and Biotechnology 99: 7907–7913

13. Rani, N. Joy, B. and Abraham, T.E. (2007) Cell suspension cultures of *Portulaca grandiflora*. as potent catalysts for biotransformation of L-tyrosine into L-DOPA, an anti-Parkinson's drug. Pharmaceutical Biology 45 (1): 48–53.

14. Raval, K.M. Vaswani, P.S. and Majumder, D.R. (2012) Biotransformation of a single amino- acid L-tyrosine into a bioactive molecule L-DoPA. International Journal of Scientific and Research Publications 2 (5): 1-9.

15. Sukumaram, C.P. Singh, D.V. Khedkar, P.D. and Mahadevan, P.R. (1979) An *Actinomycete* producing L-3,4-dihydroxyphenylalanine from L-tyrosine. Journal of Bioscience 1: 236-239.

16. Surwase, S.N. and Jadhav, J.P. (2010) Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA by a novel bacterium *Bacillus* SP. JPJ. Amio acid 41: 495-506.

17. Surwase, S.N. Patil, S.A. Jadhav, S.B. and Jadhav, J.P. (2012) Optimization of L-DOPA production by *Brevundimonas* sp. SGJ using response surface methodology. Microbial Biotechnology 5: 731-737.

18. Sushama, A.P. Onkar, A.A. Shripad, N.S. and Jyoti, P.J. (2013) Biological sources of L-DOPA: An alternative approach. Advances in Parkinson's Disease 81-87.

19. Tamura, K. Stecher, G. Peterson, D. Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725–2729.

20. Ventosa, A. Nieto, J.J. and Oren, A. (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiology and Molecular Biology Review 62: 504-544.

21. Weisburg, W.G. Barns, S.M. Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173(2): 697–703.

22. Yoshida, H. Tanaka,Y. and Nakayama, K. (1973) Production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) and its derivatives by *Vibrio tyrosinaticus*. Agricultural and Biological Chemistry 37: 2121-2126.

23. Yoshida, H. Tanaka, Y. and Nakayama, K. (1974) Production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) by *Pseudomonas melanogenum*. Agricultural and Biological Chemistry 37: 2121-21.

Isolation and Identification of *Halobacillus* sp. SL-7: A moderately halophilic bacterium with potential biological converting L-tyrosine into L-dopa

Ashengroph M. and Sayyadi M.

Dept. of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran.

Abstract

L-DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine) was first discovered in the 1960s as the most effective treatment for Parkinson's disease. In the present research, for the first time, isolation and identification of L-tyrosine-degrading moderately halophilic bacteria and evaluation their ability as biocatalyst for the bioconversion of L-tyrosine into L-dopa was studied. Using an enrichment technique in tyrosine-containing medium, the L-tyrosine-degrading strain SL-7 with the highest ability to bioconvert L-tyrosine into L-dopa was phenotypically and molecularly characterized and its 16S rDNA sequence was submitted as *Halobacillus* sp. SL-7. In order to increase the reaction efficiency and prevent the degradation of the metabolites (L-dopa), One-factor-at-a-time optimization method was used to improve the yield of L-dopa in the conversion reaction under resting cells of *Halobacillus* sp. SL-7. Based on our results, the optimum bioconversion conditions for the production of L-dopa can be summarized as follows: initial tyrosine concentration 1.5 g/l, biomass concentration 7.5 g/l, copper concentration 0.03 g/l and peptone at the concentration 1 g/l as cosubstrate. Under these conditions, the maximal L-dopa concentration (0.75 g/l with a molar yield of 46.2%) was achieved after a 36 h reaction. This is the first report on the potential of resting cells of *Halobacillus* sp. SL-7, A moderately halophilic bacterium with ability biological converting L-tyrosine into L-dopa.

Key words: Bioconversion, L-tyrosine, L- dopa, Resting cell, *Halobacillus* sp. SL-7