DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

بهینه سازی فرآیند زی تبدیلی ال تیروزین به ال دوپا توسط سویه جدید باکتری *Paenibacillus* sp. strain CT4W با استفاده از روش های تک عاملی و تاگوچی

مراحم آشنگرف[۱*]، مینا صیادی[۱] و محمد مجدی[۲]

[۱] ایران، سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی

[۲] ایران، سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

چکیده

ال-دوپا (۳و ۴ دی هیدروکسی فنیل ال-آلانین) از زمان ورود آن در ۱۹۶۰، به عنوان داروی طلایی برای درمان بیماری پارکینسون تشخیص داده شده است. در این مطالعه برای نخستین بار پتانسیل سویه جدید باکتری *Paenibacillus* sp. CT4W با قابلیت تبدیل زیستی ال-تیروزین به ال-دوپا بررسی شد. بهینه سازی پارامترهای موثر بر فرآیند زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا، تحت استراتژی سلول در حال استراحت، توسط روش‌های تک عاملی و طراحی تاگوچی انجام شد. براساس نتایج بدست آمده از بهینه سازی به روش تک عاملی، بهترین شرایط برای زی تبدیلی عبارت است از توده زیستی در غلظت ۶ گرم در لیتر، یون مس در غلظت ۰/۰۴۵ گرم در لیتر، دمای ۳۰ درجه سیلسیوس، pH برابر ۷، دور شیکر ۱۵۰ و عصاره مخمر در غلظت ۱ گرم در لیتر بعنوان سوبسترای کمکی. تحت شرایط بهینه شده فوق غلظت ال-دوپای بدست آمده پس از ۱۶ ساعت گرماگذاری ۰/۲۹ گرم در لیتر است. در ادامه از آرایه متعامد L18 طراحی تاگوچی برای بهینه سازی فرآیند استفاده 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 ۵ گرم در لیتر و یون مس در غلظت ۰/۰۳ گرم در لیتر. تحت شرایط بهینه شده فوق غلظت ال-دوپای بدست آمده پس از ۲۰ ساعت گرماگذاری ۰/۹۶ گرم در لیتر با راندمان مولی ۵۳/۵٪ است.

واژه‌های کلیدی: زی تبدیلی، ال-تیروزین، ال- دوپا، بهینه سازی، *Paenibacillus* sp. CT4W

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

مقدمه

فرآیند زی‌تبدیلی به معنای ایجاد تغییرات شیمیایی در ترکیباتی همانند اسیدهای آمینه، توکسین‌ها، زنوبیوتیک‌ها و داروها بوسیله موجودات زنده برای تولید مولکول‌های فعال از لحاظ زیستی می‌باشد. آنزیمها کاتالیزگر واکنش-های زی‌تبدیلی هستند. آنزیم تیروزیناز (مونوفنول، دی هیدروکسی فنیل آلانین: اکسیژن اکسیدو ردوکتاز) با EC نامبر ۱,۱۴,۱۸,۱ جزو گروه سه از پروتئین های مس دار می باشد که نقش مهمی در فرآیند بیوسنتز ملانین نیز ایفا می کند. یکی از مهمترین کاربردهای این آنزیم، زی تبدیلی اسید آمینه‌ی ال-تیروزین به ملکول فعال زیستی ال-دوپا می باشد (۲۲). ال-دوپا یک آنالوگ آمینواسیدی و پیش ساز دوپامین است که یکی از پرکاربردترین داروها جهت درمان پارکینسون می باشد. پارکینسون در واقع یک نوع اختلال تحلیل برنده مرتبط با پایین آمدن سطح دوپامین در مغز بوده که منجر به عوارضی همچون سفتی عضلانی، رعشه حرکتی، کند شدن توانایی تکلم و نهایتا جنون خواهد شد. مصرف مستقیم دوپامین توسط بیمار در فرایند بهبود بیماری بی تاثیر بوده چراکه دوپامین توانایی عبور از

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

سد خونی مغزی را ندارد (۴). میزان شیوع بیماری پارکینسون در غرب قاره اروپا به میزان ۱۰۰۰۰۰/۱۶۰ نفر میرسد که ۴٪ ازاین میزان را افراد بالای ۸۰ سال دربرمی گیرند (۱۶). همچنین در ایالات متحده آمریکا به تنهایی، بیش از یک میلیون بیمار مبتلا به پارکینسون گزارش شده که سالانه چیزی حدود ۶/۵ بیلیون دلار هزینه دارند. بنابراین درمانهای متفاوتی برای این بیماری توسعه یافته و از این میان ال-دوپا به عنوان موثرترین دارو مورد توجه قرار گرفته است (۲۱). فرایند سنتز شیمیایی ال-دوپا برای مصارف دارویی، چند مرحله ای بوده که درنتیجه فرایند مذکور زمانبر، نامناسب برای محیط زیست و همچنین غیراقتصادی می باشد. این در حالی است که تولید بیوتکنولوژیک ال-دوپا یک فرایند دوست دار محیط زیست بوده و در شرایط نسبتا آسانتری قابل انجام است. همچنین قابل ذکر است که فرایند زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا صرفا شامل یک مرحله اکسیداسیون توسط آنزیم تیروزیناز می باشد (۵). ال-دوپای تولیدی در نهایت در بدن و مغز توسط آنزیم ال-آرماتیک آمینواسید دکربوکسیلاز به دوپامین تبدیل خواهد شد (۴ و ۲۲). زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا برای اولین بار در قارچ خوراکی *Agaricus bisporus* گزارش شد (۱۴). سنتز میکروبی ال-دوپا توسط گونه های مختلف باکتریایی و قارچی از جمله *Erwinia herbicola* (۱۷)، *Aspergillus oryzae* (۶)، *Yarrowia lipolytica* (۷)، *Acremonium rutilum* (۱۸)، *Bacillus* sp. (۲۳)، *Aspergillus niger* (۸) و *Halobacillus* sp. SL-7 (۲) گزارش شده است. روش های طراحی آزمایش، ما را در رسیدن به تولید بهینه متابولیت های صنعتی و بهبود فرآیندهای زی تبدیلی یاری می نماید. روش آماری تاگوچی به‌عنوان یک روش قدرتمند طراحی آزمایش، امکان بررسی متغیرهای مؤثر بر فرآیند و بررسی میان کنش فاکتورهای مختلف را با انجام تعداد کمی آزمایش فراهم می‌کند (۳). در این مطالعه، برای نخستین بار ترکیب روش های تک عاملی و طراحی تاگوچی در بهینه سازی فرآیند زیست تبدیلی ال تیروزین به ال دوپا توسط سلول در حال استراحت سویه جدید باکتری *Paenibacillus* sp. CT4W بصورت موفقیت آمیز استفاده شد.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه هاو تکنیک غنی سازی: نمونه ها از مناطق مختلفی از کشور شامل نمونه های آبی جمع آوری شده از رودخانه باهوش در استان بوشهر، آب گرم اهرم- بوشهر، قنات درنگ- بوشهر، دریای رامسر، خلیج فارس، دریای خزر، چشمه زرین آباد- بیجار، رودخانه گلستان، چشمه شفابخش بانه، چشمه کلاته، چشمه سردشت، نمونه های مختلف آب چاه کرمانشاه و همدان در ظروف پلاستیکی استریل جمع آوری شدند. این نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا هنگام استفاده نگهداری شدند. برای غنی سازی و جداسازی سویه های باکتری آب زی با قابلیت تجزیه کنندگی ال-تیروزین، از محیط طراحی شده Tyr-medium agar با ترکیب زیر استفاده شد (گرم در لیتر): سولفات آهن ۰/۰۳، کلرید کلسیم ۰/۰۱۵، کلرید سدیم ۰۱/۵، سولفات منیزیم ۰/۲، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۴، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۱۲، آگار ۲۰ . به محیط مذکور به میزان ۲/۵ گرم در لیتر تیروزین به عنوان تنها منبع کربن و ازت اضافه شد. محیط های کشت مذکور به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید (۲).

زی تبدیلی ال تیروزین به ال دوپا تحت واکنش سلول-های رویشی: سویه‌های باکتریایی با قابلیت تجزیه کنندگی ال- تیروزین، در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) 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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

استفاده از سانتریفیوژ (g×۵۰۰۰ 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 (۲۰۰۷) سنجش شد (۲۱).

شناسایی فنوتیپی و ملکولی سویه باکتریCT4W: سویه باکتری CT4W که براساس آنالیزهای اسپکتروفتومتری بیشترین تولید ال-دوپا را در بین سویه های باکتری آب‌زی غربالگری شده داشت را انتخاب و مورد شناسایی ریخت شناسی، بیوشیمیایی و فیلوژنتیک قرار گرفت. شناسایی اولیه سویه مذکور براساس تست های اولیه شامل شکل ظاهری، رنگ آمیزی گرم، آزمایش اکسیداز، آزمایش کاتالاز و تست حرکت انجام گرفت. شناسایی بیشتر براساس مطالعات فیزیولوژیک و انجام تست های بیوشیمیایی متعدد شامل رشد در دماهای مختلف، تست احیای نیترات، ذوب ژلاتین، هیدرولیزنشاسته، هیدرولیز کازئین، تست متیل رد/وژپروسکوئر، تولید اسید از منابع کربوهیدراتی و طبق دستورالعمل کتاب "طبقه بندی سیستماتیک باکتری شناسی برجی" انجام شد (۱۲). به منظور شناسایی ملکولی سویه CT4W از پرایمرهای همگانی ژن ۱۶ S rDNA، fd1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و rp2 (ACGGCTACCTTGTTACGACTT) استفاده شد (۲۶). واکنش **زنجیره ای پلیمراز** (PCR) در دستگاه ترموسایکلر مدل BIO RAD T100 با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی پنج میکرولیتر مسترمیکس، یک میکرولیتر از هر پرایمر رفت و برگشت، یک میکرولیتر DNA الگو و ۵/۶ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه سترون انجام شد. چرخه حرارتی به صورت یک مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت دو دقیقه در دمای ۹۵ درجه سیلسیوس شروع و در ادامه بصورت ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سیلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۵۲ درجه سیلسیوس به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت دو دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت پنج دقیقه در نظر گرفته شد. توالی یابی محصول PCR توسط ABI3730xl DNA sequencer شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد و توالی‌های دریافتی توسط نرم افزار BioEdit ورژن7.0.5.3 ویرایش و با توالی‌های موجود در بانک ژن با استفاده از ابزار جستجوی همردیفی (BLAST) مقایسه گردید. ترسیم درخت فیلوژنیک بر پایه روش neighbor-joining با استفاده از نرم افزار MEGA.7 انجام شد (۱۹).

بهینه سازی تولید ال-دوپا از ال-تیروزین در سویه CT4W تحت سلول های 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. به منظور تهیه سلول‌های در حال استراحت باکتری آب زی بومی و استفاده از آنها به‌عنوان بیوکاتالیزگر در آزمایشات زیست تبدیلی، سلول‌های باکتری در محیط آبگوشتی TSB در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت (تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی) کشت داده شدند. سپس توده سلولی به کمک سانتریفیوژ برداشت و پس از شستشوی سلول ها در بافر فسفات، از سلول‌های برداشت شده به‌عنوان کاتالیزگر در آزمایشات زیست تبدیلی استفاده شد (۲۰). با هدف بهبود بیوترانسفورماسیون ال-تیروزین به ال-دوپا تحت سلول‌های در حال استراحت سویه مذکور، دو مرحله بهینه سازی با استفاده از روش تک فاکتوری و روش آماری تاگوچی انجام شد. با استفاده از روش تک فاکتوری تاثیر فاکتورهای مختلف شامل غلظت های مختلف بیومس سلولی (بر حسب وزن خشک)، غلظت های مختلف یون مس، اثر منابع کربن و ازت کمکی، دماهای مختلف، دور شیکرهای متفاوت و اثرات pH برروی زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا در محیط بافری فسفات (K_2HPO_4/KH_2PO_4, 100 mM) حاوی ۰/۵ گرم در لیتر سوبسترای ال-تیروزین مطالعه گردید. از

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

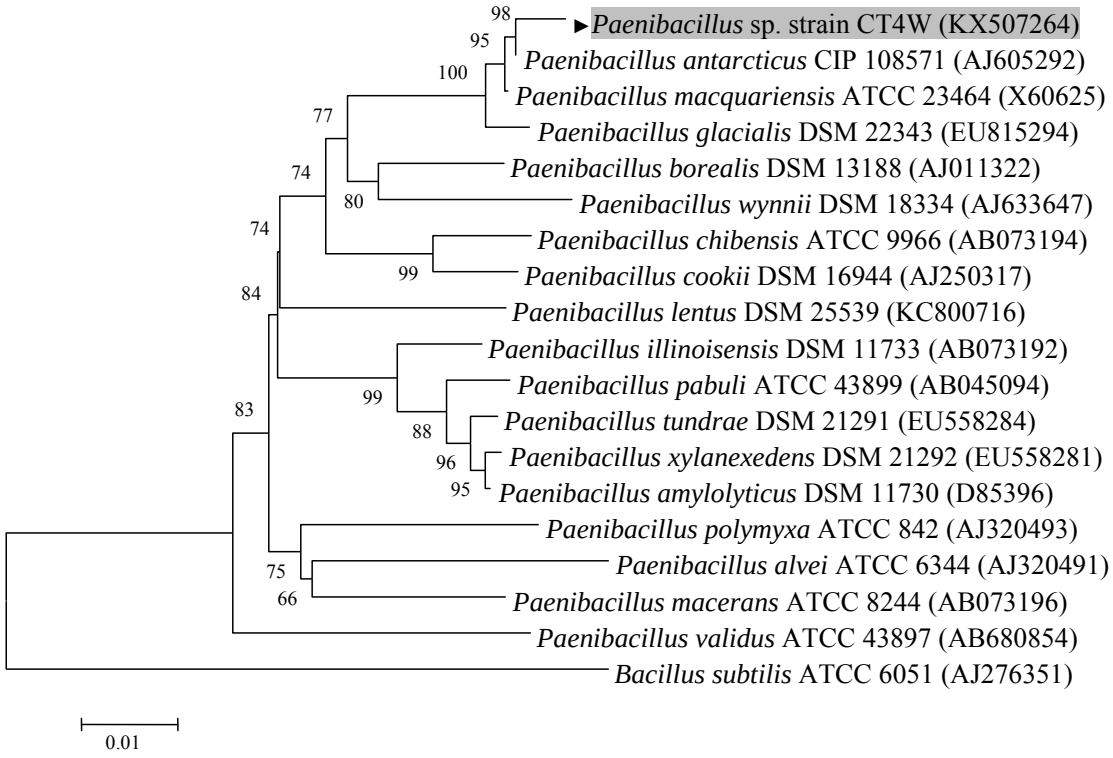
روش طراحی تاگوچی جهت ارزیابی اثر چهار متغیر مستقل شامل غلظت ال-تیروزین، غلظت توده زیستی، غلظت یون مس و غلظت عصاره مخمر بر زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا توسط سلول های در حال استراحت سویه CT4W استفاده شد. برای متغیرهای مذکور آرایه متعامد L16 طراحی شد. آزمایش ها سه بار تکرار و میانگین مقادیر آنها به‌صورت نتایج نهایی به کمک نرم افزار Qualitek-4 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و در نهایت شرایط بهینه واکنش تخمین زده شد.

تایید ساختاری ال-دوپای تشکیل شده در مخلوط واکنش بیوترانسفورماسیون: ال دوپای تولید شده در مخلوط واکنش های زی تبدیلی، ابتدا استخراج و سپس از تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، تحت شرایط کروماتوگرافی کلروفرم، بوتانول و آب با نسبت ۳: ۲: ۱ بعنوان فاز متحرک (۲۱)، تخلیص شد. شناسایی ال-دوپای تخلیص شده از طریق اسپکتروسکوپی جرمی مدل line- platform > 90% :high ساخت شرکت Micromass کشور انگلستان انجام شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتری تجزیه کننده ی تیروزین با قابلیت زیست تبدیلی به ال-دوپا: هدف از انجام این مطالعه عبارت بود از جداسازی و تشخیص سویه های باکتری تجزیه کننده ی تیروزین با توان بالقوه زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا بود. در این راستا، ۱۲ سویه باکتری با قابلیت استفاده از ال-تیروزین به عنوان تنها منبع کربن و ازت، در محیط کشت آبگوشتی TSB به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سوبسترای ال-تیروزین در غلظت نهایی ۲/۵ گرم در لیتر به محیط زیست تبدیلی افزوده شد. بعد از ۴۸ ساعت واکنش زی تبدیلی تحت سلول‌های رویشی، مورد آنالیز کمی اسپکتروفتومتری قرار گرفتند که براساس نتایج بدست آمده، از میان سویه‌های باکتری مذکور، سلول‌های رویشی سویه CT4W بالاترین میزان تولید ال-دوپا (۰/۲۸گرم در لیتر) در حضور ۲/۵ گرم در لیتر سوبسترای ال-تیروزین را نشان داد. سویه CT4W که براساس آنالیز کمی اسپکتروفتومتری دارای بیشترین میزان ال-دوپای تشکیل شده در واکنش زی تبدیلی بود انتخاب و براساس ویژگی‌های ریخت شناسی و کشتی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مورد شناسایی قرار گرفت. سویه باکتری مذکور با سیل گرم مثبت، متحرک، کاتاز و اکسیداز مثبت بود. این سویه از نظر هیدرولیز نشاسته مثبت و از نظر تست های وژپروسکوئر، احیای نیترات، هیدرولیز کازئین و هیدرولیز ژلاتین منفی بود. از نظر رشد در دماهای مختلف سویه مذکور قابلیت رشد در دمای ۴ تا ۳۵ درجه سانتی گراد را دارا بود. همچنین از نظر تخمیر منابع قندی تست های مرتبط با تولید اسید از گلوکز، مانیتول و مانوز مثبت و از نظر تولید اسید از فروکتوز و مانیتول منفی بود. براساس خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی و بر طبق کتاب‌های مرجع و مقالات منتشره در این ارتباط، سویه CT4W به طور موقت به‌عنوان *Paenibacillus* تشخیص داده شد. براساس نتایج حاصل از همردیفی این سویه دارای بیش از ۹۷ درصد مشابهت با سویه های متعلق به *Paenibacillus antarcticus* می باشد. بعد از تعیین توالی ژن 16S rDNA، این ژن در بانک ژنی با شماره دسترسی KX507264 ثبت شد. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنیکی نیز تائید کرد که سویه‌ی مورد نظر به جنس *Paenibacillus* تعلق دارد و علاوه بر این احتمالا می تواند بطور می‌تواند به عنوان سویه‌ی *Paenibacillus antarcticus* از طبقه بندی شود. ترسیم درخت فیلوژنی که بر اساس آنالیزهای توالی ژن ۱۶S rDNA به روش neighbor-joining بدست آمده است، موقعیت سویه‌ی CT4W در جنس *Paenibacillus* آمده است (شکل ۱).

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7



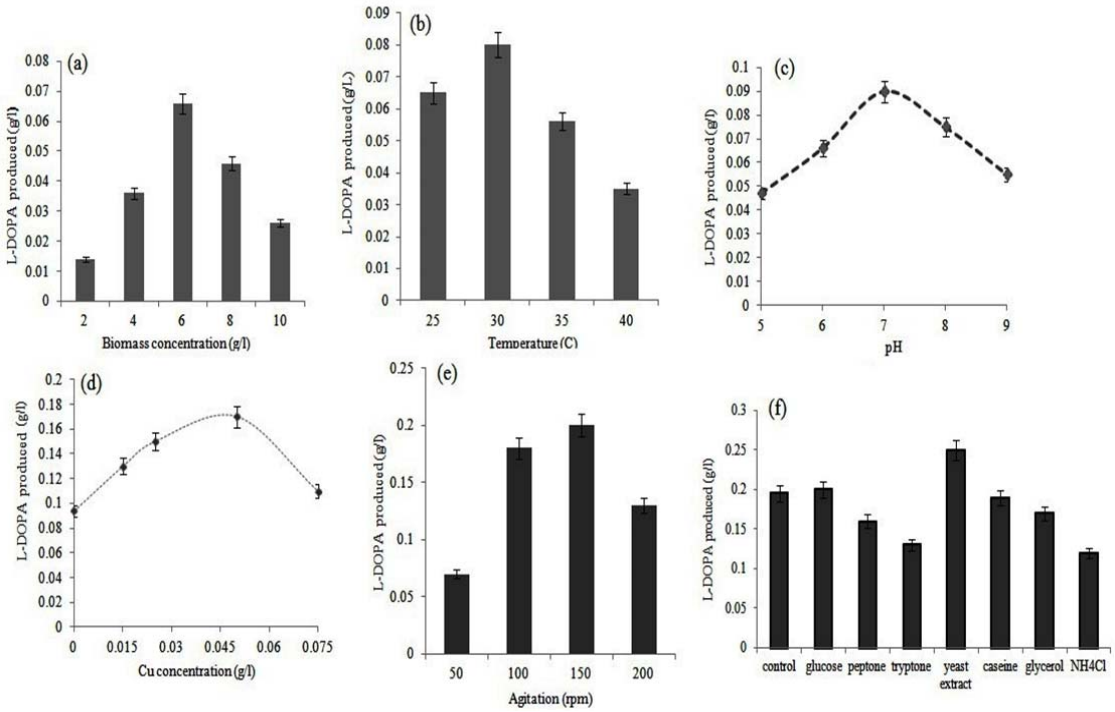
شکل ۱- درخت فیلوژنی سویه‌ی CT4W و دیگر اعضای جنس *Paenibacillus* بر اساس ژن تکثیریافته‌ی ۱۶S rDNA با استفاده از روش neighbor-joining و نرم افزار MEGA. 7. شماره دسترسی سویه های ثبت شده در پرانتز آورده شده است.

نتایج بهینه سازی زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا در باکتری *Paenibacillus* sp. CT4W با استفاده از روش-های تک فاکتوری و تاگوچی: براساس نتایج بدست آمده از بهینه سازی به روش تک فاکتوری، بیشترین میزان تولید ال-دوپا در غلظت ۶ گرم در لیتر توده‌ی سلولی، غلظت یون مس ۰/۰۴۵ گرم در لیتر مشاهده شد. از بین منابع کربنی و ازتی استفاده شده بیشترین میزان تولید ال- دوپا در حضور عصاره مخمر مشاهده شد. میزان تولید ال-دوپا در دماها ، pH ها و دور شیکر متفاوت هم سنجیده شد. بیشترین تولید ال-دوپا در دمای ۳۰ درجه، pH برابر ۷ و دور شیکر ۱۵۰ rpm مشاهده شد (شکل ۲).

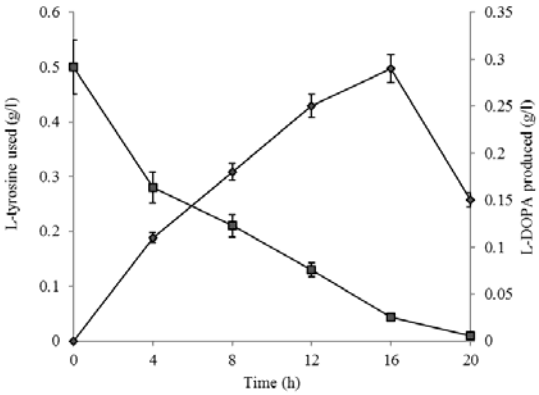
در ادامه و با هدف بهبود بیوترانسفورماسیون ال-تیروزین به ال-دوپا، اثرات دوره‌ی انکوباسیون تحت شرایط بهینه شده در مخلوط واکنش زی تبدیلی مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). براساس نتایج بدست آمده، تحت شرایط بهینه شده بالا، ۰/۲۹گرم در لیتر ال-دوپا از ۰/۵ گرم در لیتر ال-تیروزین پس از ۱۶ ساعت واکنش زی تبدیلی تولید شده است. راندمان مولی تولید ال-دوپا از ال-تیروزین در فرآیند فوق ۵۳/۳ درصد بوده است.

براساس نتایج بدست آمده از بهینه سازی مرحله اول، بهترین ترکیب فاکتورها برای تولید ال-دوپا از ال-تیروزین در باکتری *Paenibacillus* sp. CT4W عبارتند از: بیومس سلول در غلظت ۶ گرم در لیتر، یون مس در غلظت ۰/۰۴۵ گرم در لیتر، عصاره مخمر در غلظت ۱ گرم در لیتر، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، pH برابر ۷ و دور شیکر ۱۵۰ rpm.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7



شکل ۲- اثرات پارامترهای مختلف بر روی تولید ال-دوپا از ال-تیروزین در باکتری *Paenibacillus* sp. CT4W در محیط بافری فسفات حاوی ۰/۵ گرم در لیتر ال-دوپا تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار۱± معرف انحراف معیار است.



شکل ۳- بیوترانسفورماسیون ال-تیروزین به ال-دوپا بوسیله سلول‌های در حال استراحت *Paenibacillus* sp. CT4W تحت شرایط بهینه شده توسط روش تک فاکتوری. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش و بار۱± معرف انحراف معیار است. نمودار مربع مربوط به ال تیروزین مصرف شده و نمودار دایره مربوط به ال دوپای تشکیل شده در مخلوط واکنش زی تبدیلی است.

پس از انتخاب بهترین ترکیب فاکتورها، بهینه سازی مرحله دوم بوسیله روش تاگوچی انجام شد. در این راستا، غلظت ال-تیروزین (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ گرم در لیتر)، غلظت یون مس (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳ و ۰/۰۴ گرم در لیتر)، غلظت عصاره مخمر (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ گرم در لیتر) و غلظت بیومس سلول (۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ گرم در لیتر) به عنوان فاکتورهای موثر بر روی تولید ال-دوپا تحت شرایط سلولهای در حال استراحت در نظر و در چهار سطح در نظر گرفته شدند. لازم به ذکر است که تمامی آزمایشات تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی گراد، pH برابر ۷ و دور شیکر بهینه شده ۱۵۰ rpm و مدت زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت انجام شده است. با توجه به تعداد فاکتورها، سطوح و تاثیر متقابل دوتایی بین فاکتورها، درجه آزادی برابر ۱۵ می باشد که لزوم انتخاب آرایه متعامد L16 (انجام ۱۶ آزمایش مختلف) را به عنوان یک آرایه استاندارد

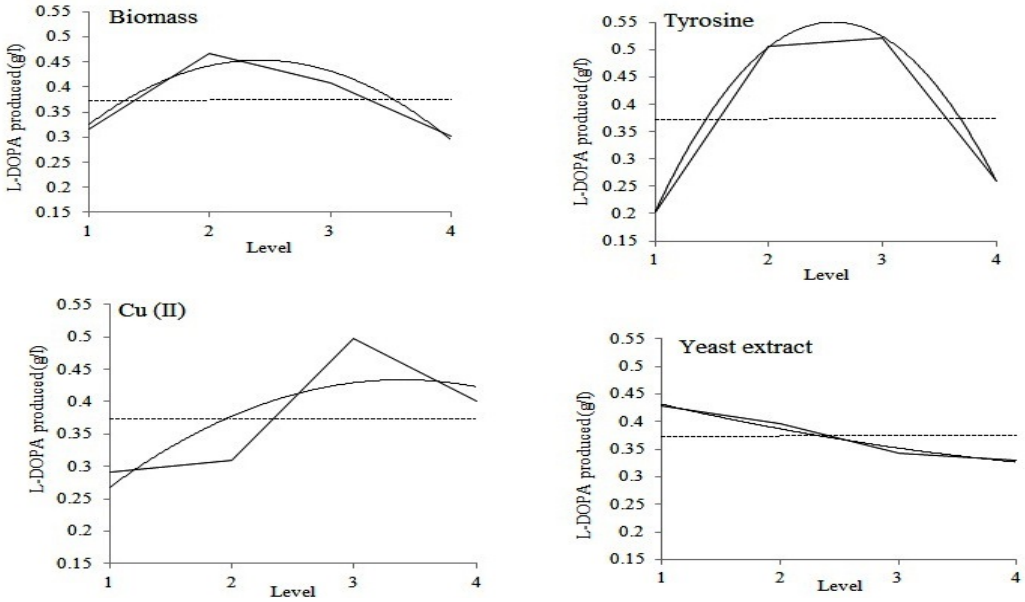
DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

ایجاب می کند (جدول ۱). در جدول فوق غلظت های ال-دوپای تولیدی در ۱۶ آزمایش مختلف اجرا شده ارائه شده است. نتایج نشان داد که مقدار ال-دوپا در مخلوط واکنش زیست تبدیلی براساس اثر ترکیبی فاکتورهای انتخاب شده در محدوده بین ۰/۱۱ تا ۰/۶۸ گرم در لیتر می باشد.

جدول ۱- آرایه متعامد L16

Serial no.	1 Biomass	2 Tyrosine	3 Cu^{+2}	4 Yeast extract	L-DOPA produced (g/l)
1	1	1	1	1	0.13
2	1	2	2	2	0.32
3	1	3	3	3	0.64
4	1	4	4	4	0.18
5	2	1	2	3	0.23
6	2	2	1	4	0.51
7	2	3	4	1	0.68
8	2	4	3	2	0.45
9	3	1	3	4	0.29
10	3	2	4	3	0.61
11	3	3	1	2	0.43
12	3	4	2	1	0.30
13	4	1	4	2	0.17
14	4	2	3	1	0.59
15	4	3	2	4	0.34
16	4	4	1	3	0.11

اثر اصلی هر یک از فاکتورهای فردی بر روی تولید ال-دوپا در شکل (۴) نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می شود مقادیر بالاتری از ال-دوپا در سطوح سه مس و ال-تیروزین و همچنین درسطح دو بیومس مشاهده شده است. سطح مناسب برای عصاره مخمرسطح یک می باشد. در واقع با بررسی اثرات اصلی هر کدام از پارامترهای مورد مطالعه می توان روند کلی تاثیر فاکتورها را بر روی فرآیند مورد نظر تمایز داد (۳).



شکل ۴- اثر فاکتورهای فردی در سطوح محتلف بر روی زیست تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا در سویه باکتری آب زی *Paenibacillus* sp. CT4W

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

با استفاده از روش تاگوچی می توان اینترکشن بین دو فاکتور مختلف را بررسی نمود که نتایج در جدول (۲) ارائه شده است. در واقع با مطالعه اینترکشن‌ها می توان نتیجه گرفت که تولید یک محصول خاص، بر حسب اینترکشن بین فاکتورها متفاوت بوده و تاثیر یک فاکتور متاثر از سطح فاکتور دیگری است. همانگونه که در جدول (۲) مشاهده می شود در مجموع ۶ اینترکشن مشاهده شده که بالاترین میزان اینترکشن (۴۱/۲۲ درصد) بین مس و بیومس سلول است و کمترین اینترکشن (۷/۸۹ درصد) بین بیومس سلول و تیروزین است که خود نشان دهنده‌ی این است که اثر یک فاکتور روی تولید ال-دوپا کاملا وابسته به شرایط فاکتورهای دیگر در فرآیند بهینه سازی تولید ال-دوپا می باشد.

جدول ۲- ۶ اینترکشن تخمین زده شده بوسیله نرم افزار Qualitek-4

Serial no.	Factors	Columns[a]	SI (%)[b]	Col[c]	Opt[d]
1	Biomass × Cu^{+2}	1 × 3	41.22	2	[2, 4]
2	Biomass × Yeast extract	1 × 4	36.84	5	[2, 1]
3	Tyrosine × Yeast extract	2 × 4	27.19	6	[3, 1]
4	Tyrosine × Cu^{+2}	2 × 3	25.43	1	[3, 4]
5	Cu^{+2} × Yeast extract	3 × 4	24.56	7	[4, 1]
6	Biomass × Tyrosine	1 × 2	7.89	3	[2, 3]

[a]SI (severity index) : شاخص شدت اینترکشن برای پارامترهای مختلف

[b]Opt: نشان دهنده سطوح مطالوب فاکتورها برای شرایط بهینه سازی

برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از روش تحلیل واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده شد که نتایج در جدول (۳) ارائه شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می شود غلظت اولیه ال-تیروزین، غلظت اولیه یون مس و بیومس سلول دارای بیشترین تاثیر بر تولید ال-دوپا بوده اند و در مقابل کمترین تاثیر را عصاره مخمر داشته است. نتایج جدول ANOVA بصورت ۲ قسمتی قبل از عمل pooling و بعد از عمل pooling) نشان داده شده که دلایل آن در زیر توضیح داده شده است. اساسا پس از تشکیل جدول ANOVA و انجام آزمون معنی داری باید واریانس خطاء انجام بگیرد که این عمل در روش تاگوچی با استفاده از تکنیک pooling انجام می شود (۳و ۹). در این روش فاکتورهایی که تاثیر ناچیز دارند بعنوان منبع خطاء در نظر گرفته می شوند. برای این منظور به ستونهای S یا P در جدول ANOVA مراجعه نموده و عواملی را که دارای کمتر از ۱۰درصد تاثیر داشته باشند، pool می شوند (لازم به ذکر است که در برخی پروسه های صنعتی این مقدار متفاوت است). پس از مرحله pooling ، جدول ANOVA اصلاح شده و فاصله اطمینان محاسبه شده و در صورتی که فاصله اطمینان محاسبه شده از فاصله مطلوب کوچکتر شود، عمل pooling ادامه پیدا کرده و در غیر اینصورت متوقف می شود. بدین ترتیب فاکتورهایی که pool نشده باشند به عنوان فاکتورهای با تاثیر معناداری معرفی می شوند. در ارتباط با آزمایش فوق، قبل از عمل pooling فاصله اطمینان فاکتورهای ال-تیروزین، مس و بیومس سلول که بیشترین تاثیر پذیری را داشتند به ترتیب ۹۶/۸ درصد، ۹۷/۳ درصد و ۹۶/۶ درصد بودند. سایر فاکتورها زیر ۹۵ درصد بودند. به دنبال عمل pooling و حذف عصاره مخمر که دارای کمترین تاثیرپذیری بودند، فاصله اطمینان برای فاکتورهای ذکر شده در بالا به ترتیب به ۹۹/۶ درصد، ۹۹/۲ درصد و ۹۸/۸ درصد افزایش یافته است (جدول ۳).

برای تعیین شرایط بهینه از آنالیز Bigger to Better استفاده شد. سطح مطلوب، میزان تاثیرپذیری و همچنین بیشترین میزان ال-دوپا تولیدی پیش بینی شده تحت شرایط بهینه در جدول (۴) نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می شود فاکتورهایی مانند بیومس سلول، ال-تیروزین و یون Cu^{+2} نسبت به دیگر فاکتورها دارای

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

تاثیرپذیری بیشتر در زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا بوده اند. مقدار ال-دوپا پیش بینی شده تحت شرایط بهینه حدود ۰/۷۳۲ گرم در لیتر بوده است.

جدول ۳- نتایج ANOVA (قبل و بعد از تکنیک pooling)

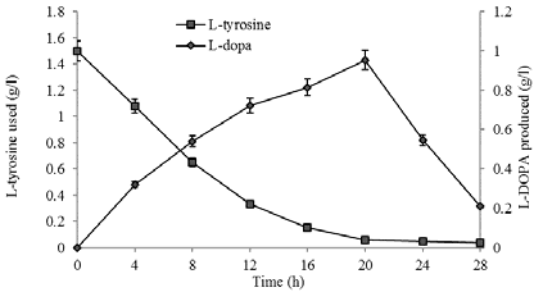
Serial no.	Factor	Before pooling						After pooling					
		DOF	Sum of Squares	Variance	F-Ratio	Pure Sum	Percent	DOF	Sum of Squares	Variance	F-Ratio	Pure Sum	Percent
1	Biomass	3	0.072	0.024	9.657	0.065	12.065	3	0.072	0.024	9.657	0.065	12.065
2	Tyrosine	3	0.325	0.108	43.284	0.318	58.928	3	0.325	0.108	43.284	0.318	58.928
3	Cu^{+2}	3	0.109	0.036	14.581	0.102	18.926	3	0.109	0.036	14.581	0.102	18.926
4	Yeast extract	3	0.024	0.008	3.232	0.016	3.111	(3)	(0.024)		pooled	(CL=82 .7%)	0.00
Other/ error		3	0.006	0.002			6.970	6	0.030	0.005			10.081
Total		15	0.539				100.00	15	0.539				100.00

جدول ۴- شرایط بهینه و مقدار وانیلین تولیدی پیش بینی شده توسط نرم افزار Qualitek-4

Serial no.	Factor	Level description (g/l)	Level	Contribution
1	Biomass	5	2	0.093
2	Tyrosine	1.5	3	0.148
3	Cu^{+2}	0.03	3	0.118

contribution from all factors: 0.358
Current grand average of performance: 0.373
Expected result at optimum condition: 0.732

برای انجام آزمایش تاییدی میزان ال-دوپای تولیدی پیش بینی شده تحت شرایط بهینه، با میزان ال-دوپای بدست آمده در شرایط آزمایش با یکدیگر مقایسه می شود و چنانچه در فاصله مطلوب قرار گیرد طراحی آزمایش درست و بهینه سازی به پایان می رسد. به همین دلیل آزمایشی با استفاده از سلول های در حال استراحت سویه باکتری مذکور در محیط بافری فسفات (۱۰۰ میلی مولار) و براساس ترکیب سطح بهینه متغیرهای بدست آمده در جدول (۴) انجام و میزان ال-دوپای بدست آمده ارزیابی شد. براساس نتایج بدست آمده، میزان ال-دوپای تولیدی بدست آمده (۰/۷۲۸ گرم در لیتر) با میزان ال-دوپای تولیدی پیش بینی شده (۰/۷۳۲ گرم در لیتر) در فاصله مطلوب قرار گرفته است. در ادامه و با هدف بهبود واکنش زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا، اثرات دوره ی گرماگذاری تحت شرایط بهینه شده از طریق روش تاگوچی در مخلوط واکنش زی تبدیلی مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۵). براساس نتایج بدست آمده، تحت شرایط بهینه شده بالا، ۰/۹۶گرم در لیتر ال-دوپا از ۱/۵ گرم در لیتر ال-تیروزین پس از ۲۰ ساعت واکنش زی تبدیلی تولید شده است. راندمان مولی تولید ال-دوپا از ال-تیروزین در فرآیند فوق ۵۳/۵ درصد بوده است.

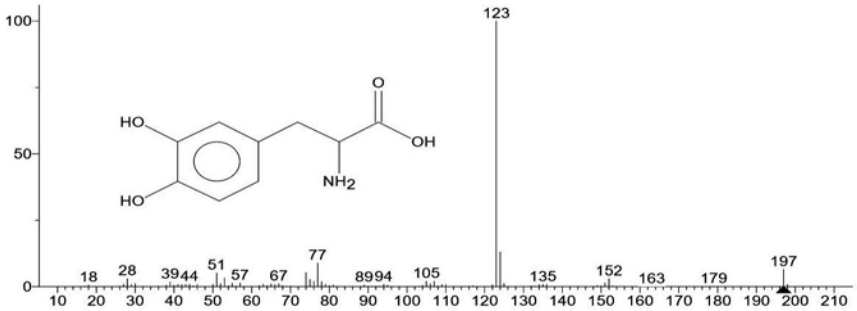


شکل ۵- زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا بوسیله سلول‌های در حال استراحت *Paenibacillus* sp. CT4W تحت شرایط بهینه شده توسط روش آماری تاگوچی. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش و بار۱± معرف انحراف معیار است. نمودار مربع مربوط به ال تیروزین مصرف شده و نمودار دایره مربوط به ال دوپای تشکیل شده در مخلوط واکنش زی تبدیلی است.

در نهایت، ال-دوپای تولید شده در مخلوط واکنش زی تبدیلی، پس از استخراج و تخلیص از طریق TLC ، مورد آنالیز اسپکتروسکوپی جرمی قرار گرفت (شکل ۶).

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

براساس نتایج طیف سنجی جرمی، وزن ملکولی ال-دوپای بدست آمده ۱۹۷ گرم بر مول (m/z=197) بود که نمایانگر سنتز موفقیت آمیز ال-دوپا در واکنش زی تبدیلی است.



شکل ۶- آنالیز اسپکتروسکوپی جرمی ال-دوپای سنتز شده در واکنش زی تبدیلی توسط سویه ی باکتری *Paenibacillus* sp. CT4W

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه های باکتری آبزی بومی با پتانسیل زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا مورد مطالعه قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های ساکن در زیست‌گاه‌های دریایی نسبت به انواع خشکی‌زی ازنظر خصوصیات فیزیولوژیک و تنوع متابولیکی متفاوت بوده و به‌طورمعمول توانمندی بالایی در تولید فرآورده‌های فعال زیستی دارند. با توجه به سازگاری طولانی‌مدت میکروارگانیسم‌های ساکن در زیست‌گاه دریایی با شرایط سخت محیطی ازنظر دما، pH، فشار، غلظت‌های مختلف نمک و عناصر کمیاب، کاندیدهای مناسب به‌عنوان کاتالیزورهای مبتنی بر شیمی سبز محسوب می‌شوند. از میکروب‌های دریازی می‌توان به‌صورت طبیعی و بدون نیاز به دست‌کاری ژنتیکی برای این فرآیند بهره جست (۱۱). در این راستا در بخش نخست این تحقیق، در طی یک برنامه غربالگری با هدف جداسازی انواع سویه های باکتری آب زی با قابلیت تجزیه کنندگی ال-دوپا و پتانسیل آنها برای مصرف ال-تیروزین به عنوان تنها منبع کربن و ازت، ۱۲ سویه باکتری غربال گری شد که براساس نتایج بدست آمده از آنالیزهای کمی اسپکتروفتومتری، سلول های رویشی سویه باکتری *Paenibacillus* sp. strain CT4W (جدا شده از یک نمونه آب جمع آوری شده از سواحل بوشهر) ، به عنوان سویه برتر در تولید ال-دوپا انتخاب شد. در ادامه این تحقیق با هدف افزایش راندمان واکنش زی تبدلی و جلوگیری از تجزیه بیشتر متابولیت های 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 زی تبدیلی استفاده نموده اند (۱، ۱۰ و ۲۰). براساس نتایج بدست آمده چهار فاکتور شامل ال-تیروزین، یون مس، عصاره مخمر و بیومس سلول دارای بیشترین تاثیرپذیری بودند که موید فعالیت بیشتر آنزیم مسئول فرآیند زیست تبدیلی مربوطه (آنزیم تیروزیناز) در این شرایط می باشد. فاکتورهای مذکور بعنوان فاکتورهای تاثیرگذار انتخاب شده و در طی بهینه سازی مرحله دوم از روش آماری تاگوچی جهت یافتن ترکیب بهینه فاکتورهای مذکور استفاده شد. روش آماری تاگوچی یکی از پرکاربردترین روش‌های فاکتوریل جزئی می‌باشد. در این روش تعدادی از ترکیب‌های ممکن بین فاکتورها انتخاب می‌شوند و پس از انجام شدن آزمایش با ارزیابی آماری پاسخ‌های به‌دست‌آمده بهترین وضعیت که ممکن است در بین حالت‌های آزمایش‌شده موجود نباشد، عنوان شرایط بهینه تعیین می‌گردد. از مزیت‌های این روش، بررسی تأثیر عوامل چندگانه و مستقل مؤثر در آزمایش، بررسی اینترکشن های احتمالی بین فاکتورها و کاهش تعداد

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

آزمایش‌ها در مقیاس آزمایشگاهی و صنعتی است (۹). برای انجام آزمایشات چهار فاکتور ال-تیروزین، یون مس، عصاره مخمر و بیومس سلول انتخاب و از طرح آزمایش تاگوچی L16 برای مطالعه فاکتورها و تعاملات بین آنها استفاده شد. براساس نتایج بدست آمده عوامل با تاثیر معنی داری بر زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا به ترتیب اهمیت یون مس، غلظت اولیه سوبسترای ال-تیروزین و بیومس ورودی تعیین شدند.. تحت شرایط بهینه در سطوح انتخاب شده این فاکتورها، ماکزیمم غلظت ال-دوپا در سطح معنی داری ۵٪ ($p< 0.05$) ۰/۷۲۸گرم درلیتر تخمین زده شده است. نتایج نشان داد که طراحی تاگوچی ابزاری قدرتمند برای بهینه سازی و بهبود زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا در سویه مورد مطالعه بوده چرا که در مرحله اول بهینه سازی به روش تک فاکتوری علیرغم تعدد آزمایشات، بیشترین میزان ال-دوپای تولیدی ۰/۲۹گرم درلیتر بوده که پس از بهینه سازی انجام شده با روش تاگوچی این میزان به ۰/۷۲۸ گرم درلیتر افزایش یافته است. پس از مشخص شدن ترکیب بهینه فاکتورها وسیله روش تاگوچی، با هدف افزایش غلظت ال-دوپا تولیدی در مخلوط واکنش زی تبدیلی اثر دوره گرماگذاری بررسی شد. براساس نتایج بدست آمده، تحت شرایط بهینه شده بالا، ۰/۹۶گرم در لیتر ال-دوپا از ۱/۵ گرم در لیتر ال-تیروزین پس از ۲۰ ساعت واکنش زی تبدیلی تولید شده است. راندمان مولی تولید ال-دوپا از ال-تیروزین در فرآیند فوق ۵۳/۵ درصد بوده است. از آنجایی که بیوتکنولوژیست‌ها همواره به دنبال روش‌هایی هستند که با صرف کمترین هزینه اقتصادی و در کمترین زمان، بیشترین راندمان را بدست آورند، لذا تلاش‌های زیادی صورت گرفته است تا به کمک فرآیندهای بهینه سازی (بهبود شرایط محیطی و تغذیه‌ای) بتوان راندمان زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا توسط میکرواورگانیسم‌ها را بهبود بخشید. امروزه برای صرف‌جویی در زمان و هزینه-های پژوهشی، دانشمندان علم بیوتکنولوژی از یکسری روش‌های آماری در فرآیندهای بهینه‌سازی استفاده می‌کنند. روش پاسخ سطحی (۲۵)، فاکتوریل کامل (۱۷ و ۲۴)، طراحی پلاکت-بورمن (۸) و روش آماری تاگوچی (که در مطالعه‌ی اخیر از آن استفاده شده است) برخی از روش‌های آماری مورد استفاده در بهینه سازی فرآیندهای زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا می‌باشند. از مزایای روش‌های آماری این است که با استفاده از آن‌ها می‌توان اثرات فاکتورهای مختلف را بصورت همزمان بررسی و برهمکنش‌های احتمالی آن‌ها را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. با مقایسه مطالعه اخیر با گزارشات منتشر شده در ارتباط با زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا (جدول ۵)، می توان به راندمان های قابل قبول بدون استفاده از تکنیک های پیچیده و یا اضافه نمودن موادی که مستلزم صرف هزینه های بالای اقتصادی هستند، دست یافت.

جدول ۵- مقایسه راندمان ال-دوپای بدست آمده از واکنش های زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا در میکروارگانیسم‌های مختلف

Microorganism	Yield of L-dopa	References
Paenibacillus sp. CT4W	0.96 mg/ml	Current study
Halobacillus sp. SL-7	0.75 mg/ml	۲
Aspergillus oryzae IAM2625	0.88 mg/ml	۱۵
Aspergillus oryzae ME2	0.428 mg/ml	۶
Acremonium retilum	0.89 mg/ml	۱۸
Aspergillus niger PA2	2.44 mg/ml	۴
Yarrowia lipolytica NRRL-143	2.96 mg/ml	۷
Egyptian halophilic black yeast	66 µg/ml	۱۳
Vibrio tyrosinaticus	4 mg/ml	۲۷
Bacillus sp. JPJ	0.497 mg/ml	۲۳
Brevundimonas sp. SGJ	3.81 mg/ml	۲۴
Brevundimonas sp. SGJ	3.61 mg/ml	۲۵

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

بنابراین استفاده از روش های بهینه سازی انجام شده در این تحقیق را می توان برای سویه های مشابه پیشنهاد نمود. لازم به توضیح است که مطالعه اخیر نخستین گزارش از زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا در جنس باکتری *Paenibacillus* است.

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 پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۳، صفحات ۳۱۶-۳۳۴.

۲- آشنگرف، م و صیادی, م. ۱۳۹۹. جداسازی و شناسایی باکتری نمک دوست *نسبی* *Halobacillus* sp.SL-7 با پتانسیل زی تبدیلی ال-تیروزین به ال-دوپا. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران), ۱۳۹۹جلد ۳۳، شماره ۱، صفحات ۲۸-۴۱.

۳- آشنگرف، م و ارجمند، ر. ۱۳۹۹. طراحی ماتریکس ترکیبی L18 تاگوچی برای بهبود عملکرد مخمر بومی *Trichosporon* sp. cas se5 در حذف سلنیت. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، جلد ۱۰، شماره ۱، صفحات ۲۰۲۰-۲۰۲۸.

4- Agarwal, P. Pareek, N. Dubey, S. Singh, J. and Singh, R. P. (2016) *Aspergillus niger* PA2: a novel strain for extracellular biotransformation of L-Tyrosine into L-DOPA. Amino acids 48(5): 1253-1262.

5- Algieri, C. Donato, L. Bonacci, P. and Giorno, L. (2012) Tyrosinase immobilised on polyamide tubular membrane for the l-DOPA production: Total recycle and continuous reactor study. Biochemical Engineering Journal 66: 14-19.

6- Ali, S. and Haq, I. (2006) Kinetic basis of celite (CM 2: 1) addition on the biosynthesis of 3, 4-dihydroxyphenyl-l-alanine (l-DOPA) by *Aspergillus oryzae* ME 2 using l-tyrosine as a basal substrate. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22(4): 347-353.

7- Ali, S. and Shultz, J. L. (2007) High performance microbiological transformation of L-tyrosine to L-dopa by *Yarrowia lipolytica* NRRL-143. BMC Biotechnology 7(1): 50.

8- 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(1): 86.

9- Ashengroph, M. Nahvi, I. Zarkesh-Esfahani, H. and Momenbeik, F. (2010) Optimization of media composition for improving conversion of isoeugenol into vanillin with *Pseudomonas* sp. strain KOB10 using the Taguchi method. Biocatalysis and Biotransformation 28: 339–347.

10- Ashengroph, M. and Amini, J. (2017) Bioconversion of isoeugenol to vanillin and vanillic acid using the resting cells of *Trichosporon asahii*. 3 Biotech 7(358).

11- Baker, S. Harini, B. P. Rakshith, D. and Satish, S. (2013) Marine microbes: invisible nanofactories. Journal of Pharmacy Research 6: 383–388.

12- Bergey, D. H. and Holt, J. G. (1994) Williams, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

13- Doaa, A. R. Magda, A. and Bendary, E. L. (2010) Production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) by Egyptian halophilic black yeast. World Journal of Microbiology Biotechnology 27: 39-46.

14- Halaouli, S. Asther, M. Sigoillot, J. C. Hamdi, M. and Lomascolo, A. (2006) Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. Journal of Applied Microbiology 100(2): 219-232.

15- 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.

16- Jagtap, K. and Chavan, M. (2014) Bioconversion of L-tyrosine to L-dopa by novel bacterium

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.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

Bacillus cereus isolated from wadala region. Indian Streams Research Journal 4(8): 1-10.

17- Koyanagi, T. Katayama, T. Suzuki, H. Nakazawa, H. Yokozeki, K. and Kumagai, H. (2005) Effective production of 3, 4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR. Journal of Biotechnology, 115(3): 303-306.

18- Krishnaveni, R. Rathod, V. Thakur, M. S. and Neelgund, Y. F. (2009) Transformation of L-tyrosine to L-DOPA by a novel fungus, *Acremonium rutilum*, under submerged fermentation. Current Microbiology 58(2): 122-128.

19- Kumar, S. Stecher, G, and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870–1874.

20- Mohammadi Bolbanabad, E. Ashengroph, M. and Darvishi, F. (2020) Development and evaluation of different strategies for the clean synthesis of silver nanoparticles using *Yarrowia lipolytica* and their antibacterial activity, Process Biochemistry 94: 319-328.

21- 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.

22- 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: 2250-3153.

23- Surwase, S. N. and Jadhav, J. P. (2011) Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA by a novel bacterium *Bacillus* sp. JPJ. Amino Acids 41(2): 495-506.

24- Surwase, S. N. Patil, S. A. Apine, O. A. and Jadhav, J. P. (2012) Efficient microbial conversion of l-tyrosine to l-DOPA by *Brevundimonas* sp. SGJ. Applied Biochemistry and Biotechnology 67: 1015-1028.

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

26- 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: 697–703.

27- 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.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.9.7

Process optimization using single-factor experiments and Taguchi methodology for biotransformation L-Tyrosine into L-DOPA by a novel bacterium *Paenibacillus* sp. strain CT4W

Ashengroph M.[1*], Sayyadi M.[1] and Majdi M.[2]

[1] **Dept. of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran.**

[2] **Dept. of Plant Biotechnology, College of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran.**

Abstract

Since the introduction of L-dopa (3, 4-dihydroxylphenyl-L-alanine) in the 1960s, L-dopa has been recognized as a gold-standard medical therapy for Parkinson's disease. In the present work, a newly tyrosine-transforming strain of *Paenibacillus* sp. CT4W was used for the biotransformation of L-tyrosine to L-DOPA. The process parameters were optimized using single- factor experiments and Taguchi design methodology under resting cell strategy. Based on the values obtained in single-factor experiments, the optimum parameters for L- DOPA production: cell mass 6g/l, Cu^{+2} 0.045 g/l, Temperature 30º C, pH 7, agitation 150 rpm and 0.5 g/l of yeast extract as cosubstrate. The maximum yield achieved with these parameters was 0.29 g/l after 16 h incubation. A Taguchi L16 orthogonal array was subsequently employed for further optimization. The biotransformation reaction having 5 g/l cell mass, 1.5 g/l tyrosine and 0.03 g/l Cu^{+2} was found to be optimum for maximum L-DOPA production. Under the optimized conditions, resting cells of *Paenibacillus* sp. CT4W produced 0.96 g/l L-DOPA, with a molar yield of 53.5 % after 20 h incubation.

Key words: Bioconversion, L-tyrosine, L- dopa, Optimization, *Paenibacillus* sp. CT4W