

Pseudomonas sp.에 의한 Caffeine으로부터 Theobromine의 생산

방원기* · 김성균 · 이일석

고려대학교 자연자원대학 응용생명환경화학학과

초 록 : Caffeine으로부터 theobromine을 생산하기 위하여 토양으로부터 theobromine 생산능력이 있는 5종의 균주를 선별하였다. 그들 중 CT-017 균주가 theobromine 생산능력이 가장 우수하였으며 *Pseudomonas* sp.로 부분동정되었다. Theobromine 생산에 있어서, 탄소원과 질소원으로는 5 g/l fructose와 5 g/l beef extracts가 가장 우수하였으며, 0.02 g/l Fe²⁺, threonine 1.0 g/l을 사용하였을 때 가장 효과적이었다. 최적배양온도 및 초기 pH는 각각 28°C 및 6.5이었다. 상기의 최적조건하에서, 23시간 배양하였을 때, 15 g/l caffeine으로부터 7.98 g/l의 theobromine이 생산되었으며 이때의 전환율은 53.2% 이었다.(1998년 10월 28일 접수, 1998년 11월 30일 수리)

서 론

자연계에서 발견되는 pseudoalkaloid의 일종인 caffeine과 theobromine, theophylline은 xanthine의 methyl 유도체로서 모두 중추 신경계의 흥분제로서 작용하며, 강심작용, 기관지 및 혈관 확대작용, 이뇨작용, 골격근 수축성의 증가 작용, 호흡 흥분작용 등을 한다.^{1,2)} 그러나 theobromine은 caffeine과는 달리 중추신경과 순환기에 대해 부작용을 지니지 않아 치료제로서 강심약으로 울혈성 부전(congestive heart failure)에 사용되며, 기관지 천식(bronchial asthma)과 기관지 확장 효과에 사용되며, 또한 심장성 부종(cardiac edema)에 주로 사용되고 있다.^{2,3)} Theobromine을 생산하는 방법에는 3가지가 있다. 첫째로는 theobromine을 함유하는 식물로부터 추출 정제하는 것이며, 둘째로는 3-methyl urea 등으로부터 복잡한 과정을 거쳐 화학합성하는 것이다. 셋째로는 미생물을 이용하여 caffeine 대사산물중의 하나인 theobromine을 얻는 것이다.⁴⁾ 미생물에 의한 theobromine의 다량생산은 1993년에 Asano 등⁵⁾에 의해 처음으로 수행되어 caffeine으로부터 theobromine을 생산을 보고한 후에 변이주를 이용한 연구도 보고되었지만 국내에서는 아직 수행된 바가 없다.

본 연구에서는 미생물을 이용하여 caffeine으로부터 theobromine을 생산하기 위하여 유일한 탄소원 및 에너지원으로 caffeine을 자화할 수 있는 미생물을 분리 및 선별한 후, theobromine 생산을 위한 배양조건 최적화 및 생산조건을 검토하였다.

재료 및 실험방법

사용균주

본 실험에서 사용한 theobromine 생산균주는 토양으로부터

분리, 선별한 *Pseudomonas* sp. CT-017 균주를 사용하였다.

사용배지

균주의 분리 및 선별을 위하여 사용한 배지는 Asano 등⁵⁾의 최소배지를 변형하여 0.5%(w/v) caffeine, 0.5 g/l KH₂PO₄, 1.0 g/l K₂HPO₄, 1.0 g/l NaCl, 0.5 g/l MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g/l yeast extracts 를 포함하는 최소배지(medium I)를 사용하였고, 생산배지로는 5.0 g/l caffeine, 0.5 g/l yeast extracts, 5.0 g/l K₂HPO₄가 포함된 배지(medium II)를 사용하였다.

Theobromine의 정성적 확인

본 실험에서 caffeine으로부터 생산한 화합물이 theobromine 인지를 확인하기 위하여 Asano 등⁵⁾이 사용한 TLC 및 HPLC를 이용하여 정성적으로 확인하였다.

분리균주의 동정

분리 및 선별된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁶⁾에 따라 수행하였다.

결과 및 고찰

Theobromine 생산 균주의 분리 및 선별

미생물을 이용하여 caffeine으로부터 theobromine을 생산하기 위하여 토양으로부터 caffeine을 theobromine으로 전환하는 능력이 있는 미생물을 분리하고자 하였다. 유일한 탄소원 및 질소원으로서 0.5%(w/v)의 caffeine을 함유하는 최소배지를 사용하여 30°C에서 48시간 배양한 후, 균체를 이용하여 2.0%(w/v)의 caffeine을 함유하는 반응액에서의 균주의 theobromine 생산능력을 측정하였다. 그 결과 생육 및 theobromine 생산능력이 우수한 균주를 Table 1에 나타내었다. CT-017 균주가 타균주에 비하여 생육도 우수하고

찾는말 : caffeine, theobromine, production, *Pseudomonas* sp.

*연락처

Table 1. Composition of cell growth and theobromine productivity of the isolated microorganisms

Strains	Growth (O.D. at 610 nm)	Theobromine (g/l)
CT-017	0.62	0.26
CT-023	0.19	0.09
CT-042	0.15	0.09
CT-068	0.21	0.11
CT-091	0.16	0.08

Cultivation was carried out at 30°C for 48 hours in medium I at pH 7.0. Reaction was carried out at 30°C for 3 hours in a reaction mixture containing 20 g/l of caffeine, 5.0 g/l of yeast extract, and 2.0 g/l of KH₂PO₄ at pH 7.0.

theobromine 생산능력이 가장 좋았기 때문에 생산균주로 최종 선별하였다.

분리 균주의 동정

순수분리한 균주 CT-017의 생리적, 생화학적 특성을 살펴본 결과는 Table 2와 같았으며 그 결과들을 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*에 비교하여 본 균주는 *Pseudomonas* sp.로 부분 동정하였다.

배양조건의 최적화

(1) Theobromine 생산에 미치는 탄소원의 영향

Theobromine 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 caffeine이 5 g/l씩 함유되어 있는 생산배지에 caffeine 이외에 다음의 탄소원을 첨가하여 배양시간에 따른 균체의 생육과 theobromine의 생산량을 관찰하였다. Table 3에서와 같이 fructose를 사용하였을 때 균체의 생육 및 theobromine의 생산량이 6.91 g/l로서 가장 좋았다.

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain

Characteristics	CT-017
Morphological characteristics	
motility	+
Gram test	rod
Assimilation of carbon compounds	
D-glucose	+
D-fructose	+
D-xylose	+
D-gluconate	+
sucrose	-
mannose	+
Physiological characteristics	
catalase	+
oxidase	+
nitrate reduction	+
starch hydrolysis	-
gelatin hydrolysis	-
casein hydrolysis	-
methyl red	-
arginine dihydrolase	+
O/F test oxidative	oxidative

*Symbols: +, positive; -, negative

Table 3. Effect of carbon sources on theobromine production by *Pseudomonas* sp. CT-017

Carbon source (5 g/l)	Growth (O.D. at 610 nm)	Theobromine (g/l)
None	1.23	1.25
Glucose	1.94	4.62
Fructose	2.81	6.91
Xylose	1.62	1.36
Glycerol	2.38	5.39

*Cultivation was carried out at 30°C for 25 hours in medium II containing 5 g/l of caffeine and 5 g/l of different carbon sources at pH 7.0. After 13 hours cultivation, 10 g/l of caffeine and 0.02 g/l of FeSO₄ · 7H₂O were added to the production medium.

(2) Theobromine 생산에 미치는 fructose 농도의 영향

Theobromine 생산에 미치는 fructose 농도의 영향을 조사하기 위하여 theobromine 생산배지에 fructose를 5 g/l에서 20 g/l까지 첨가하고 배양시간에 따른 균체의 생육과 theobromine의 생산량을 관찰하였다. Table 4에 나타난 바와같이 5 g/l의 fructose를 사용하였을 때 균체의 생육 및 theobromine의 생산량이 가장 좋았으며 그 이상의 농도에서는 생산량이 증가하지 않았으며 오히려 소량 감소하는 경향을 보였다. 따라서 본 실험에서는 fructose의 농도는 5 g/l를 사용하였다.

(3) Theobromine 생산에 미치는 유기질소원의 영향

Theobromine 생산에 미치는 유기 질소원의 영향을 살펴 보기 위하여 유기 질소원을 첨가하였을 경우에는 Table 5에 나타난 바와같이 beef extracts를 사용하였을 경우에 생산된

Table 4. Effect of fructose concentrations on theobromine production by *Pseudomonas* sp. CT-017

Fructose concentrations (g/l)	Growth (O.D. at 610 nm)	Theobromine (g/l)
None	1.31	1.29
5	2.75	6.91
10	2.70	6.72
15	2.68	6.68
20	2.64	6.51

*Cultivation was carried out at 30°C for 25 hours in medium II containing 5 g/l of caffeine and 0~20 g/l of fructose at pH 7.0. After 13 hours cultivation, 10 g/l of caffeine and 0.02 g/l of FeSO₄ · 7H₂O were added to the production medium.

Table 5. Effect of nitrogen sources on theobromine production by *Pseudomonas* sp. CT-017

Nitrogen source (5 g/l)	Growth (O.D. at 610 nm)	Theobromine (g/l)
None	2.76	6.91
Beef extract	2.97	7.10
Peptone	2.64	6.77
Soytone	2.22	2.60
Tryptone	2.75	6.88
Yeast extract	2.33	5.42

*Cultivation was carried out at 30°C for 25 hours in medium II containing 5 g/l of caffeine and 5 g/l of fructose at pH 7.0. After 13 hours cultivation, 10 g/l of caffeine and 0.02 g/l of FeSO₄ · 7H₂O were added to the production medium.

theobromine의 양은 7.10 g/l로서 최대량을 보였으며 soytone 이나 yeast extracts의 경우에는 대조구에 비하여 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 대부분의 유기질 소원의 첨가가 생육 및 theobromine 생산을 증가시켰던 Asano 등⁹⁾의 결과와는 다른 결과였다. 따라서 질소원으로는 5 g/l의 beef extracts를 사용하였다.

(4) Theobromine 생산에 미치는 activator의 영향

Caffeine 분해효소의 활성화에 2가 금속이온을 첨가할 때 영향을 줄 수 있는 것으로 보고⁹⁾되었기 때문에 본 실험에서는 2가 금속이온들의 첨가 효과를 살펴보기 위하여 0.02 g/l의 금속이온들을 첨가하여 theobromine의 생산량을 관찰하였다. Table 6에 나타난 바와같이 Fe²⁺와 Mg²⁺의 경우에는 theobromine 생산량이 증가하였지만 나머지 금속이온들은 첨가시에 theobromine의 생산량이 금속이온이 첨가되지 않은 대조구에 비하여 감소하는 결과를 보였으며 Fe²⁺가 가장 좋은 결과를 보였다. 또한 Fe²⁺ 농도의 영향을 살펴본 결과 Table 7에 나타난 바와같이 0.02 g/l의 Fe²⁺이온을 첨가하였을 때 7.10 g/l로서 가장 좋은 결과를 보였으며 첨가하여 준 Fe²⁺의 농도가 증가할수록 생산되는 theobromine의 양은 감소하는 결과를 나타내었다.

(5) Theobromine 생산에 미치는 amino 산의 영향

Theobromine 생산에 미치는 아미노산의 영향을 조사하기 위하여 생산배지에 arginine, glycine, aspartic acid, glutamic

Table 6. Effect of metal ions on theobromine production by *Pseudomonas* sp.CT-017

Metal ion (0.02 g/l)	Growth (O.D. at 610 nm)	Theobromine (g/l)
None	2.21	5.13
Al ³⁺	2.01	5.02
Co ²⁺	1.47	3.13
Cu ²⁺	1.35	2.28
Fe ²⁺	2.81	7.10
Mg ²⁺	2.05	5.60
Mn ²⁺	2.00	4.96
Ni ²⁺	1.77	3.48
Zn ²⁺	1.75	3.59

*Cultivation was carried out at 30°C for 25 hours in medium II containing 5 g/l of caffeine and 5 g/l of fructose at pH 7.0. After 13 hours cultivation, 10 g/l of caffeine and 0.02 g/l of different metal ions were added to the production medium.

Table 7. Effect of Fe²⁺ concentrations on theobromine production by *Pseudomonas* sp.CT-017

Fe ²⁺ concentrations (g/l)	Growth (O.D. at 610 nm)	Theobromine (g/l)
None	2.21	5.13
0.02	2.83	7.10
0.04	2.57	7.04
0.06	2.31	5.74
0.08	2.16	4.91
0.10	2.05	4.52

*Cultivation was carried out at 30°C for 25 hours in medium II containing 5 g/l of caffeine and 5 g/l of fructose at pH 7.0. After 13 hours cultivation, 10 g/l of caffeine and 0-0.10 g/l of FeSO₄ · 7H₂O were added to the production medium.

Table 8. Effect of amino acids on theobromine production by *Pseudomonas* sp.CT-017

Amino acid (1 g/l)	Growth (O.D. at 610 nm)	Theobromine (g/l)
None	2.56	7.10
Arginine	2.91	6.69
Aspartic acid	2.54	6.10
Glutamic acid	2.44	2.14
Glycine	2.88	6.11
Threonine	2.92	7.22

*Cultivation was carried out at 30°C for 25 hours in medium II containing 5 g/l of caffeine, 5 g/l of fructose and 1 g/l of different amino acid at pH 7.0. After 13 hours cultivation, 10 g/l of caffeine and 0.02 g/l of FeSO₄ · 7H₂O were added to the production medium.

acid 및 threonine을 1.0 g/l씩 첨가하여 theobromine의 생산량을 살펴보았다. Table 8에 나타난 바와같이 대조구보다 아미노산 첨가시 균체의 생육은 증가하였으나 theobromine의 생산량은 arginine과 threonine만이 증가하였고 나머지 아미노산에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다. Threonine을 첨가하였을 때 7.22 g/l로서 가장 좋은 결과를 보였다.

(6) Theobromine 생산에 미치는 배양 초기 pH의 영향

Theobromine 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 배양액의 초기 pH를 5.0에서 8.0에 이르기까지 변화시켜 균체의 생육 및 theobromine의 생산량을 검토하였다. Table 9에 나타난 바와같이 초기 pH 6.5 이하에서는 균체의 생육 및 theobromine의 생산량이 급격히 감소하였으며 초기 pH 6.5에서 7.94 g/l로서 최대량을 나타내었고 그 이상의 pH에서도 소량 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 배양 초기 pH는 6.5로 하였다.

(7) Theobromine 생산에 미치는 배양온도의 영향

Theobromine 생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 배양온도를 25, 28, 30, 33, 37°C에서 균체의 생육 및 theobromine 생산량을 검토하였다. Table 10에서와 같이 배양 온도 28°C에서 7.98 g/l의 theobromine이 생산되어 최대량이었으며 그 이외의 온도에서는 감소하는 결과를 나타내었다.

(8) Theobromine 생산의 경시적 변화

이상의 결과로부터 얻어진 최적 조건하에서 *Pseudomonas*

Table 9. Effect of initial pH on theobromine production by *Pseudomonas* sp.CT-017

Initial pH	Growth (O.D. at 610 nm)	Theobromine (g/l)
5.0	0.29	-
5.5	0.27	-
6.0	0.49	1.75
6.5	3.40	7.94
7.0	3.63	7.22
7.5	3.03	6.54
8.0	3.15	6.71

Cultivation was carried out at 30°C for 25 hours in medium II containing 5 g/l of caffeine, 5 g/l of fructose and 1 g/l of threonine at different initial pH range 5.0-8.0. After 13 hours cultivation, 10 g/l of caffeine and 0.02 g/l of FeSO₄ · 7H₂O were added to the production medium.

Table 10. Effect of cultivation temperature on theobromine production by *Pseudomonas* sp. CT-017

Temperature (°C)	Growth (O.D. at 610 nm)	Theobromine (g/l)
25	1.43	3.84
28	3.57	7.98
30	3.20	7.94
33	2.89	4.46
37	1.53	1.40

Cultivation was carried out at 25~37°C for 25 hours in medium II containing 5 g/l of caffeine, 5 g/l of fructose and 1 g/l threonine at pH 6.5. After 13 hours cultivation, 10 g/l of caffeine and 0.02 g/l of FeSO₄·7H₂O were added to the production medium.

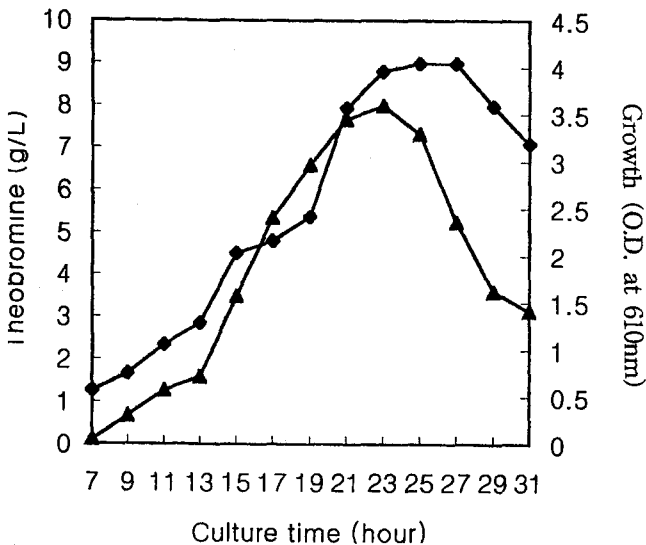


Fig. 1. Time course of theobromine production by *Pseudomonas* sp. CT-017. ▲—▲: theobromine, ◆—◆: O.D. *Cultivation was carried out at 28°C for 25 hours in medium II containing 5 g/l of caffeine, 5 g/l of fructose and 1 g/l of threonine at pH 6.5. After 13 hours cultivation, 10 g/l of caffeine and 0.02 g/l of FeSO₄·7H₂O were added to the production medium.

sp. CT-017 균주를 사용하여 caffeine으로부터 theobromine 생산의 경시적 변화를 조사한 결과 Fig. 1과 같았다. *Pseudomonas* sp. CT-017 균주의 생육은 25시간에 이르기까지

는 꾸준히 증가하였으며 그 이상의 시간에서는 감소하였는데 이러한 결과는 Asano 등⁹의 결과에 비해 유도기가 더 길었다. Theobromine의 생산에 있어서는 증식초기에는 theobromine 생산은 생육이 증가함에 따라 증가하였지만 배양 13시간이후 부터 그 생산량이 급격히 증가하였으며 23시간째에 7.98 g/l로서 최대량에 이른 후에 시간이 지남에 따라 급격히 감소하는 결과를 보였다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 교육부 학술연구조성비(생물화학공학) 연구비에 의해서 연구된 결과이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Lelo, A., D. J. Birkett, and R. A. Robson (1986) Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **22**, 177-182.
- Simons, F. E. R. and A. B. Becker (1985) The bronchodilator effect and pharmacokinetics of theobromine in young patients with asthma. *J. Clin. Immun.* **76**, 703-707.
- Cornish, H. H. and A. A. Christman (1957) A study of metabolism of theobromine, theophylline, and caffeine in man. *J. Biol. Chem.* **228**, 315-323.
- Gluck, M. and Lingens F. (1987) Studies on the microbial production of theobromine and heteroxanthine from caffeine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 334-340.
- Asano, Y., T. Komeda, and A. Amada (1993) Microbial production of theobromine from caffeine. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**(8), 1286-1289.
- Asano, Y., T. Komeda, and H. Yamada (1994) Enzymes involved in theobromine production from caffeine by *Pseudomonas putida* No.352. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 2303-2304.
- Sneath, P. H. A., N. S. Nair, M. E. Shape, and J. G. Holt (1986) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 8th Ed., Vol. 2, The Williams and Wilkins Co. Baltimore.

Production of theobromine from caffeine by *Pseudomonas* sp.

Won-Gi Bang*, Sung-Kyoon Kim and Il-Seok Lee (Department of Agricultural Chemistry, Korea university, Seoul 136-701)

Abstracts : For the production of theobromine from caffeine, 5 strains of bacteria capable of producing theobromine were isolated from soil. Among them, the strain CT-017 showed the best ability of producing theobromine, and was partially identified as a *Pseudomonas* sp. For the production of theobromine, fructose was the most effective carbon source at an optimum concentration of 5 g/l. The most effective nitrogen source was 5 g/l of beef extracts. And 0.02 g/l of Fe²⁺, 1.0 g/l of threonine were effective for the production of theobromine. The optimum temperature and initial pH were 28°C and 6.5, respectively. After 23 hr cultivation, 7.98 g/l of theobromine was produced from 15 g/l of caffeine which corresponds to a conversion yield of 53.2%.

Key words : caffeine, theobromine, production, *Pseudomonas* sp.

*Corresponding author