

استفاده از سلول های در حال استراحت سویه ی بومی غربال گری شده Rhodotorula sp. CW03 در بیوترانسفورماسیون کافئین به تیوفیلین و پاراگزانتین

دکتر مرجم آشنگرف*، دکتر مسعود حیدری زاده*، مریم برچلوبی**

دریافت: ۹۳/۱۱/۴ پذیرش: ۹۴/۲/۲۱

چکیده:

مقدمه و هدف: در سال های اخیر کاربرد میکروارگانسیم ها به عنوان کاتالیست های زیستی امکان تولید فرآورده های طبیعی با ارزش، با کاربرد درمانی را تسهیل نموده است. فرآیند بیوترانسفورماسیون میکروبی کافئین علاوه بر حذف زیستی کافئین سمی از محیط های آلوده، امکان تولید ترکیبات دی متیل گزانتینی ارزشمند مورد استفاده در صنایع پزشکی و دارویی را فراهم کرده است. در این مطالعه سعی بر شناسایی مخمرهای بومی است که بتوانند به عنوان کاتالیست واکنش تبدیل زیستی کافئین را به تیوفیلین و پاراگزانتین انجام دهند.

روش کار: در این مطالعه تجربی ۱۴ سویه مخمری تجزیه کننده ی کافئین که براساس تفاوت های مورفولوژیک از هم تفکیک شده بودند، به عنوان بیوکاتالیست برای تبدیل زیستی سوبسترای ارزان قیمت کافئین به دی متیل گزانتین های با ارزش افزوده بالا مانند تیوفیلین و پاراگزانتین برگزیده شدند. سویه منتخب مورد شناسایی فنوتیپی و ژنتیکی قرار داده شد. غربال گری با استفاده از آنالیزهای کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) انجام شد.

نتایج: بررسی همزمان آنالیزهای UV و HPLC تحت شرایط سلولهای در حال استراحت سویه مخمری Rhodotorula sp. CW03 (با شماره دسترسی KF414531 در بانک ژن) منجر به شناسایی دو متابولیت اصلی (تیوفیلین و پاراگزانتین) حاصل از بیوترانسفورماسیون کافئین شد. در این واکنش بیوترانسفورماسیون، بیشترین مقادیر تیوفیلین (۳۸۰ میلی گرم در لیتر) با راندمان مولی ۱۶/۴ درصد و پاراگزانتین (۸۸۰ میلی گرم در لیتر) با راندمان مولی ۳۷/۹ درصد پس از به ترتیب ۷۲ و ۱۲۰ ساعت واکنش بیوترانسفورماسیون حاصل شد.

نتیجه نهایی: این مطالعه جداسازی و شناسایی مخمرهای تجزیه کننده کافئین را به عنوان کاتالیست های ایمن و ارزان قیمت در تولید دی متیل گزانتین های طبیعی با ارزش را از سوبسترای ارزان قیمت کافئین پیشنهاد می نماید.

کلید واژه ها: بیوترانسفورماسیون / تیوفیلین / دی متیل گزانتین / ردوترولا / کافئین

مقدمه:

دارای اثرات جانبی بسیاری برای انسان می باشد و مصرف طولانی مدت آن باعث ایجاد سردرد، کوفتگی، تحریکات فوق کلیوی، نامنظمی فعالیت کلیوی، نامنظمی فعالیت ماهیچه ای، نامنظمی در فعالیت قلب، تپش قلب، ناراحتی های معده، اضطراب، لرزش بدن، افزایش سطح هموسیستئین پلاسما، افزایش فشارخون، بی خوابی و اغلب بیماری های حاد قلبی می شود (۴-۲). مصرف کافئین در دوران بارداری بر رشد جنین تاثیر منفی می گذارد و احتمال ناهنجاری ها و سقط های خودبه خودی را افزایش

کافئین (۱ و ۷۳ تری متیل گزانتین) یک ترکیب متیل گزانتینی مهم است که با فرمول شیمیایی $C_8H_{10}N_4O_2$ به خانواده ی آلکالوئیدهای پورینی که توسط گیاهان تولید می شوند تعلق دارد. کافئین یک ماده ی تحریک کننده ی روانی (روانگردان) است که باعث افزایش هوشیاری شده و با غلبه بر خستگی باعث حفظ تمرکز می شود (۱). علیرغم کاربرد گسترده کافئین در ساخت نوشیدنی هایی مثل چای، قهوه و تعداد زیادی نوشیدنی غیر الکلی، کافئین

* استادیار گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی دانشکده علوم دانشگاه کردستان (m.ashengroph@uok.ac.ir)

** کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی دانشکده علوم دانشگاه کردستان

باعث انتقال یون‌های کلسیم به بافت ماهیچه‌ای اسکلتی می‌شود (۱۱).

با توجه به شباهت ساختاری بین کافئین و مشتقات متیل‌گزانتینی، در دو دهه گذشته مطالعات قابل توجهی با هدف استفاده از میکروارگانیسم‌ها به عنوان بیوکاتالیزورهای مبتنی بر شیمی سبز برای تجزیه زیستی و بیوترانسفورماسیون میکروبی سوبسترای ارزان قیمت کافئین به انواع متیل‌گزانتین‌های با ارزش مانند تئوفیلین، تیوبرومین و پاراگزانتین صورت گرفته است (۱۲، ۱۳). بیوترانسفورماسیون کافئین توسط سویه‌های میکروبی مختلف از جمله *Penicillium roqueforti* (۱۳)، *Aspergillus niger* (۱۴)، *Stemphylium sp.* (۱۵)، *Serratia marcescens* (۱۶)، *Pseudomonas putida* (۱۷)، کشت مخلوط *Klebsiella* و *Rhodococcus* (۱۸)، *Pseudomonas alcaligenes*، *Rhizopus delemar* (۱۹)، *Trichosporon asahii* (۲۱) گزارش شده است. محتوی آنزیمی بالا و فعال بودن مسیرهای متابولیسمی متعدد در مخمرها یکی از ویژگی‌های برجسته‌ای است که این میکروارگانیسم‌ها را به ابزاری مناسب برای مطالعات بیوترانسفورماسیون میکروبی تبدیل نموده است و لذا این مطالعه با هدف جداسازی مخمرهای بومی تجزیه‌کننده کافئین، شناسایی فنوتیپی و ژنتیکی سویه برتر و بررسی امکان تولید تئوفیلین و پاراگزانتین از واکنش بیوترانسفورماسیون کافئین تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت به عنوان بیوکاتالیزور انجام شده است.

روش کار:

مواد و محیط‌های کشت: در این مطالعه تجربی برای انجام آزمایشات بیوترانسفورماسیون از کافئین، تیوبرومین و تئوفیلین با خلوص بالای ۹۹ درصد و پاراگزانتین با خلوص بالای ۹۸ درصد (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) استفاده شد. متانول با درجه خلوص بسیار بالا مخصوص دستگاه HPLC و صفحات کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) آلومینیومی با فاز ثابت سیلیکاژل 60F254 از شرکت مرک تهیه شد (E. Merck, Darmstadt, Germany). محیط کشت Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar از شرکت Quelab، انگلستان، خریداری شد. گلوکز، عصاره مخمر و پپتون جهت ساخت محیط‌های سنتتیک YPD (Yeast Peptone Dextrose) از مرک، آلمان خریداری شد. آگار جهت جامد کردن محیط‌های کشت از شرکت

می‌دهد (۵). علاوه بر موارد ذکر شده مصرف بیش از غلظت متوسط کافئین (۱۵۰ میلی‌گرم در روز) باعث ایجاد پوکی‌استخوان در زنان می‌شود (۲). با توجه به اثرات جانبی کافئین، درخواست افراد جهت استفاده از نوشیدنی‌ها و محصولات غذایی بدون کافئین روز به روز در حال افزایش می‌باشد. بنابراین، تولید محصولات غذایی عاری از کافئین از منظر سلامتی برای انسان حائز اهمیت می‌باشد که این امر تحقیقات صورت گرفته جهت شناسایی سویه‌های میکروبی تجزیه‌کننده کافئین را به خوبی توجیه می‌سازد. کافئین در مقایسه با دی‌متیل‌گزانتین‌های دیگر از جمله تئوفیلین، پاراگزانتین و تیوبرومین به علت داشتن یک گروه متیل اضافی دارای خاصیت تحریکی زیاد همراه با اثرات زیان‌آور برای سلامتی می‌باشد. برداشت گروه‌های متیل اثرات زیان‌آور مولکول کافئین را کاهش داده و خواص درمانی با ارزش مشتقات حاصل را افزایش می‌دهد در نتیجه دی‌متیل‌گزانتین‌های مشتق شده از کافئین دارای خواص دارویی فراوان از جمله خواص ضدآسم، ضد سرطان و آنتی‌اکسیدان می‌باشند. امروزه از تئوفیلین (۱ و ۳ دی‌متیل-گزانتین) برای درمان بیماری‌های تنفسی مانند انسداد ریوی مزمن (Chronic obstructive pulmonary disease) و آسم استفاده‌ای فراوان می‌شود (۶، ۷). عملکردهای اصلی تئوفیلین در بدن شامل شل کردن عضلات صاف لوله‌های هوایی، افزایش انقباض و کارایی ماهیچه‌ی قلب، افزایش فشار خون، اثرات تحریکی بر روی سیستم عصبی مرکزی خصوصاً مرکز کنترل تنفس است (۸). یکی دیگر از مکانیسم‌های تئوفیلین که باعث استفاده از آن به عنوان دارو شده، مهار فاکتور رشد بافتی بتا (Transforming growth factor beta) است. این فاکتور در بیماران مبتلا به COPD و آسم باعث تبدیل فیبروبلاست‌های ریوی به میوفیبروبلاست می‌شود و از این طریق باعث بیماری‌زایی می‌شود (۹). پاراگزانتین (۱ و ۷ دی‌متیل‌گزانتین) با فرمول شیمیایی $C_7H_8N_4O_2$ اصلی‌ترین متابولیت مسیر کاتابولیسم کافئین در انسان است. پاراگزانتین در بدن باعث مهار سنتز لکوترین‌ها شده و از این طریق واکنش‌های التهابی و همچنین ایمنی ذاتی را سرکوب می‌کند (۱۰). یکی دیگر از ویژگی‌های پاراگزانتین عملکرد انرژی‌زایی آن است به طوری که باعث افزایش غلظت اسیدهای چرب موجود در پلاسما می‌شود. پاراگزانتین همچنین با تحریک فعالیت پمپ سدیم/پتاسیم

به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن) انتخاب شدند (۲۲). جداسازی مخمرهای تجزیه کننده کافئین: برای جداسازی سویه های مخمری با قابلیت تجزیه کافئین از محیط نمکی M9 (۲۳) حاوی ۲/۵ گرم در لیتر کافئین به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، پس از استریل کردن از طریق پالایه های غشایی میلی پور با قطر سوراخ ۰/۲۲ میکرونی افزوده شده بود، استفاده شد. ترکیب محیط نمکی M9:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/l; $CaCl_2$ 0.015 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g/l; NaCl 0.5 g/l and Phosphate buffer 100 mM pH 5.6 ± 0.1 برای جامد کردن محیط کشت مذکور

به آن ۲ درصد آگار اضافه شد. سویه های مخمری که در مرحله غنی سازی جداسازی شده بودند، روی محیط های نمکی آگار دار حاوی ۲/۵ گرم در لیتر کافئین پخش شده و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از ۷۲ ساعت سویه هایی که دارای مورفولوژی مختلف بودند نشانه گذاری شدند و برای آزمایشات بیوترانسفورماسیون کافئین انتخاب گردیدند.

غربال گری سویه های مخمری با پتانسیل بیوترانسفورماسیون کافئین به تئوفیلین: در این روش سویه های مخمری با قابلیت تجزیه کنندگی کافئین، در محیط YPD برات (گلوکز ۱۰ گرم در لیتر، پپتون ۲۰ گرم در لیتر و عصاره مخمر ۲۰ گرم در لیتر) به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس کافئین با غلظت ۲/۵ گرم در لیتر پس از فیلتراسیون از طریق پالایه های غشایی میلی پور ۰/۲۲ میکرونی، به محیط افزوده شد. پس از طی ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری اضافی، ابتدا کل مایع رویی از بیومس سلولی با استفاده از سانتریفیوژ کردن ($3000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه) جدا گردید سپس با استفاده از اسیدسولفوریک ۱۰ نرمال به دقت اسیدی شد تا تئوفیلین و دیگر گزانتین های احتمالی تشکیل شده در مخلوط واکنش بیوترانسفورماسیون به شکل آزاد خود درآیند. پس از آن هم حجم مایع رویی، اتیل استات اضافه شد. فاز آبی از فاز آلی با استفاده از سانتریفیوژ کردن ($3000 \times g$ به مدت ۱ دقیقه) جدا شد. سپس ۵ میکرولیتر از فاز اتیل استاتی جمع آوری شده با استفاده از فاز متحرک بوتانل/اسیداستیک/آب با نسبت حجمی ۴:۱:۱ مورد آنالیز TLC قرار گرفت.

شناسایی فنوتیپی و ژنتیکی سویه مخمری CW03: سویه مخمری CW03 که براساس آنالیز TLC قابلیت بیوترانسفورماسیون کافئین به تئوفیلین را در بین سویه های مخمری غربالگری شده با قابلیت تجزیه کنندگی کافئین

Quelab، انگلستان تهیه شد. نمک های کلرید سدیم، کلرید کلسیم، سولفات آهن، سولفات منیزیم و بافرهای فسفات جهت ساخت محیط های سنتتیک M9 از کمپانی های دیتکو (Detroit, MI, USA) و مرک خریداری شد. آنزیم Taq پلیمرز، نوکلئوتیدها و سایر مواد واکنش دهنده در PCR، از سیناژن تهیه شد. پرایمرهای ITS1 و ITS4 جهت شناسایی سویه های مخمری از شرکت فزایژوه خریداری شد.

نمونه برداری و غنی سازی سویه های مخمری: نمونه های مورد آزمایش از خاک های زیر کشت چای و پساب کارخانه های تولید کننده چای مناطق شمال کشور و همچنین از خاک ها، آب رودخانه ها و آب های درمانی استان هایی از کشور مانند کردستان، کرمانشاه، همدان، اهواز، اصفهان، بوشهر و شیراز جمع آوری شدند. این نمونه ها در ظروف استریل جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا هنگام استفاده نگهداری شدند. ابتدا سوسپانسیونی از نمونه های جمع آوری شده (برای نمونه های خاک ۱ گرم و نمونه های آب ۱۰ میلی لیتر) در ارلن های حاوی ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های تهیه شده به محیط های کشت Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (۵ گرم در لیتر پپتون، ۱۰ گرم در لیتر گلوکز، ۱ گرم در لیتر دی هیدروژن پتاسیم فسفات، ۰/۵ گرم در لیتر سولفات منیزیم، ۰/۰۲ گرم در لیتر دی کلوران، ۰/۰۲۵ گرم در لیتر رزبنگال، ۰/۱ گرم در لیتر آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و ۱۵ گرم در لیتر آگار با pH برابر ۵/۶) که حاوی یک گرم در لیتر کافئین بود را اضافه نموده و سپس با استفاده از میله شیشه ای سر کج استریل، به صورت چمنی کشت داده و برای مدت ۵ روز در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. بعد از آن کلنی های رشد کرده، جدا شدند و بر روی محیط کشت YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 2% agar pH 5.8 ± 0.1) حاوی یک گرم در لیتر کافئین به صورت خطی (Streak plate method) کشت داده شدند تا کلنی ها خالص شوند. سویه های خالص شده جهت نگهداری به محیط های اسلنت دار انتقال داده شدند. نمونه هایی که بر روی محیط کشت حاوی کافئین قابلیت رشد داشتند برای بررسی پتانسیل تجزیه کنندگی کافئین (رشد بر روی محیط کشت نمکی حاوی کافئین

متابولیت های اصلی حاصل از بیوترانسفورماسیون کافتین، آنالیز HPLC انجام شد. سنجش کمی میزان متیل گزانتین های ایجاد شده از بیوترانسفورماسیون کافتین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، مجهز به آشکارساز جذب UV انجام شد. در دستگاه HPLC از ستون نوع C18 (اندازه قطر ذرات فاز ثابت ۵ میکرون) به طول ۲۵ سانتیمتر و قطر داخلی ۴/۶ میلی متر استفاده شد. نوع فاز متحرک به کار گرفته شده مخلوطی از آب و متانول به نسبت ۸۰ به ۲۰ بود که به صورت ایزوکراتیک با سرعت ۱ ml در دقیقه روی ستون فرستاده شد. طول موج استفاده شده ۲۷۸ nm و حجم تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود.

نتایج:

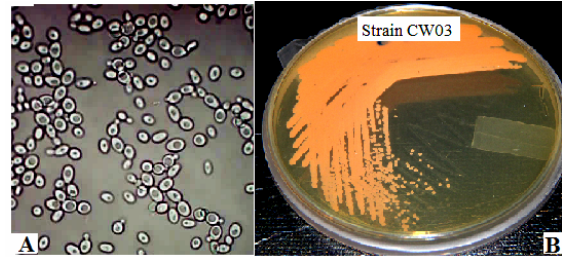
غربال گری مخمرهای با پتانسیل تبدیل زیستی کافتین به تئوفیلین: هدف از انجام این مطالعه عبارت بود از جداسازی و تشخیص سویه های مخمری با پتانسیل تجزیه کنندگی کافتین. در این راستا، ۵۳ سویه مخمری که براساس تکنیک غنی سازی غربالگری شده بودند در محیط M9-coffee agar حاوی ۲/۵ گرم در لیتر کافتین به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن کشت داده شدند که براساس نتایج بدست آمده ۱۴ سویه قابلیت رشد در محیط مذکور را دارا بودند. قابلیت بیوترانسفورماسیون سوبسترای کافتین به تئوفیلین در تمام این ۱۴ سویه با استفاده از آنالیز TLC (براساس پروتکل توضیح داده شده در بخش مواد و روش ها) مورد سنجش قرار گرفت. در بین سویه های جداسازی شده، سویه مخمری CW03 بالاترین میزان تولید تئوفیلین را نشان داد. سویه مذکور به عنوان سویه برتر مورد شناسایی ریخت شناسی، بیوشیمیایی و ژنتیکی قرار گرفت.

تعیین خصوصیت سویه مخمری CW03: سویه مخمری CW03 که براساس آنالیز TLC قابلیت بیوترانسفورماسیون سوبسترای کافتین به تئوفیلین را دارا بود، انتخاب و براساس ویژگی های مورفولوژیک تشخیصی متداول مخمرها مورد شناسایی قرار گرفت و به طور موقت به عنوان *Rhodotorula sp.* تشخیص داده شد. ویژگی های مورفولوژیک و کشتی این سویه در شکل ۱ نشان داده شده است. سویه ی CW03، از نظر میکروسکوپی، دارای کلنی به رنگ قرمز تا صورتی بوده و از نظر میکروسکوپی به صورت تک سلولی و فاقد ریشه بوده، به شکل کروی یا بیضوی های منفرد، دوتایی و یا گروهی دیده می شوند و معمولاً با جوانه زدن تکثیر می یابند.

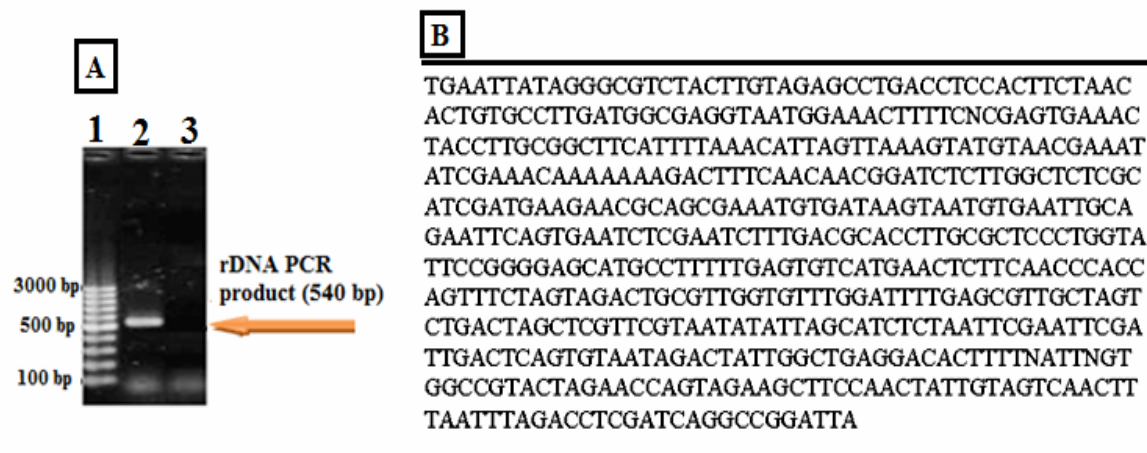
را داشت انتخاب کرده و مورد شناسایی فنوتیپی و مولکولی قرار داده شد. شناسایی سویه ی مخمری CW03 بر مبنای ویژگی های فنوتیپی، براساس استاندارد طبقه بندی کورترمن انجام شد (۲۴). جهت تشخیص مورفولوژی سلولی با میکروسکوپ نوری، لام مرطوب از کشت مایع دو روزه در محیط کشت YPD تهیه و بررسی گردید. جهت تایید جنس سویه مخمری مذکور از تعیین ترادف ژنهای ITS1-5.8S-ITS2 استفاده شد. استخراج DNA ژنومی سویه CW03 به روش تخریب با کمک دانه های شیشه ای (Glass bead disruption) روی سوسپانسیون حاصل از کشت ۲۴ ساعته مخمر در محیط کشت YPD مایع انجام شد (۲۵). پس از استخراج DNA ژنومی سویه ی مخمری CW03، با استفاده از دو پرایمر همه گانی ITS1 (forward primer: 5'-tccgtaggtgaacctgctg-3') و ITS4 (reverse primer: 5'-tctctcgcttattgatatgc-3') که از آنها برای شناسایی و طبقه بندی انواع یوکاریوتها استفاده می شود، تکثیر ژن مربوطه انجام پذیرفت. محصول تکثیری ژن های ITS1-5.8S-ITS2 طبق روش آشنگر و همکارانش شناسایی شد (۲۶). توالی یابی محصول خالص PCR توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, Seoul, Korea) انجام گرفت. جهت هم ردیفی توالی های بدست آمده با سایر توالی های موجود در بانک ژن از مرورگر BLASTN در سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) استفاده شد.

بیوترانسفورماسیون کافتین تحت سلول های در حال استراحت سویه مخمری CW03: سویه ی مخمری CW03 که براساس آنالیز TLC دارای پتانسیل تبدیل کنندگی کافتین به تئوفیلین بود انتخاب و بررسی روند کمی آزمایشات بیوترانسفورماسیون تحت سلول های در حال استراحت با استفاده از آنالیز HPLC انجام گرفت. برای این منظور، ابتدا سلول های مخمری سویه ی CW03 در محیط YPD تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی رشد داده شد (ساعت ۳۰ ام). پس از برداشت سلولها و شستشوی آنها در محیط بافر نمکی (Na₂HPO₄.12H₂O 1.5 mg/ml, KH₂PO₄ 0.3 mg/ml, NH₄Cl 0.1 mg/ml, and NaCl 0.05 mg/ml, pH 7)، از این سلول های در حال استراحت به عنوان بیوکاتالیزور در محیط بافر نمکی حاوی ۲/۵ گرم در لیتر سوبسترای کافتین برای مطالعات بیوترانسفورماسیون استفاده شد (۲۶). با هدف شناسایی

پس از شناسایی اولیه سویه ی مخمري CW03 براساس مشاهدات مورفولوژیک و آزمایشات بیوشیمیایی متداول، جهت تعیین هویت دقیق سویه CW03، شناسایی فیلوژنتیکی انجام شد. نتایج حاصل از شناسایی ملکولی با توالی حاصل از تکثیر ناحیه ژنی با پرایمرهای ویژه در شکل ۲ آمده است. براساس نتایج بدست آمده سویه مخمري CW03 تحت نام *Rhodotorula sp.* شناسایی شد.



شکل ۱: ویژگی‌های مورفولوژیک و کشتی سویه مخمري CW03
A: تصویر میکروسکوپ نوری (با بزرگنمایی ۴۰۰) از سویه مخمري پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در محیط کشت YPD برات و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد
B: سویه مخمري خالص شده در محیط کشت YPD آگار پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد



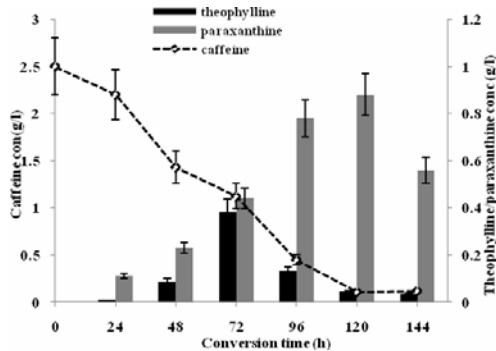
C

Accession number	Description	E-value	Similarity (%)
KF414531	<i>Rhodotorula sp.</i> CW03; ITS1 (partial sequence), 5.8S rRNA and ITS2 (complete sequence) and complete sequence 28S ribosomal RNA gene.	Sequence	strain CW03
HM545717	<i>Rhodotorula sp.</i> USM-PSY62; 18S ribosomal RNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA and ITS2 (complete) and partial sequence 28S rRNA.	0	97
JQ857037	<i>Rhodotorula glacialis</i> isolate T11RS; ITS1 (partial), 5.8S ribosomal RNA gene (complete sequence) and partial sequence Internal transcribed spacer 2.	0	96
AM922291	<i>Rhodotorula sp.</i> YSAR13; 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial sequence).	0	96
AM410637	<i>Zymoxenogloea sp.</i> SS-4A; partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and partial 26S rRNA gene, strain 4A.	0	96
EF151245	<i>Rhodotorula psychrophila</i> strain PB15; 18S ribosomal RNA gene (partial sequence), Internal transcribed spacer 1, 5.8S rRNA gene and ITS2 (complete).	0	96
AB774464	<i>Rhodotorula sp.</i> NHT-2; 18S rRNA, ITS1, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: NHT-2.	0	96
EF151249	<i>Rhodotorula glacialis</i> strain A19; 18S rRNA and 28S rRNA (partial sequence), ITS1, 5.8S ribosomal RNA gene and ITS2 (complete sequence).	0	96
KC333169	<i>Rhodotorula psychrophilica</i> isolate AU cryS04; 18S rRNA (partial), Internal transcribed spacer1, 5.8S rRNA and Internal transcribed spacer 2 (Complete).	0	93

شکل ۲: نتایج حاصل از شناسایی ملکولی سویه مخمري CW03

A: ظهور باند rDNA در منطقه ۵۴۰ جفت بازی حاصل از واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. لاین ۱ مربوط به DNA مارکر، لاین ۲ مربوط به سویه مخمري CW03، لاین ۳ کنترل منفی
B: توالی نوکلئوتیدی ژنهای ITS1-5.8S-ITS2 rDNA سویه مخمري CW03 ثبت شده با شماره دسترسی KF414531 در پایگاه اطلاعات ژنی NCBI
C: نتایج حاصل از بلاست کردن سویه مخمري CW03 و ۸ سویه مخمري بدست آمده از بانک ژنی در سایت اینترنتی NCBI

در شکل ۴ مدت زمان بیوترانسفورماسیون کافئین بوسیله سلول های در حال استراحت سویه CW03 نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده میشود، در طی ۲۴ ساعت اولیه از شروع واکنش بیوترانسفورماسیون، کافئین شروع به تجزیه شدن نموده (حدود ۱۲ درصد) و مقادیر کمی تیوفیلین (۱۰ میلی گرم در لیتر) و پاراگزانتین (۱۱۰ میلی گرم در لیتر) به عنوان دو متابولیت اصلی در محیط تجمع پیدا کرده است. با افزایش زمان واکنش تا ساعت ۱۲۰، بیش از ۹۵ درصد سوبسترای کافئین از محیط حذف شده که نشان دهنده پتانسیل بالای سویه مذکور در حذف زیستی کافئین تحت شرایط سلول های در حال استراحت است. در این پروسه بیشترین مقادیر تیوفیلین (۳۸۰ میلی گرم در لیتر) با راندمان مولی ۱۶/۴ درصد و پاراگزانتین (۸۸۰ میلی گرم در لیتر) با راندمان مولی ۳۷/۹ درصد پس از به ترتیب ۷۲ و ۱۲۰ ساعت واکنش بیوترانسفورماسیون حاصل شده است. بین ساعات ۷۲ تا ۱۴۴ کاهش قابل ملاحظه ای در سطح تیوفیلین مشاهده شد که احتمالاً به دلیل واکنشهای دی متیلاسیون بوده و منجر به متابولیزه شدن بیشتر تیوفیلین به دیگر ترکیبات متیل گزانتینی از جمله ۷- متیل گزانتین و گزانتین گردیده است.

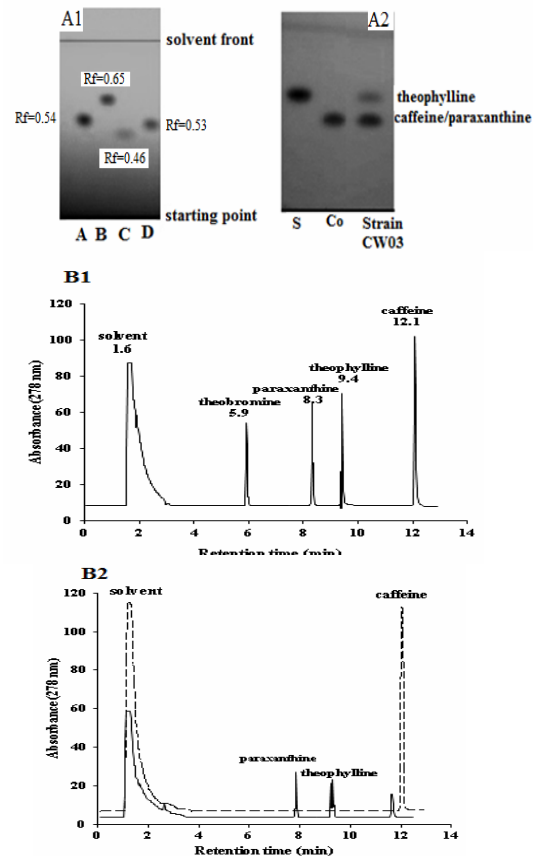


شکل ۴: بیوترانسفورماسیون سوبسترای کافئین بوسیله سلولهای در حال استراحت *Rhodotorula sp.* CW03 در محیط بافر نمکی فسفات با pH برابر ۷ و حاوی ۲/۵ گرم در لیتر کافئین، دور شیکر ۲۰۰ rpm و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در دوره زمانی ۱۴۴ ساعت

بحث:

کافئین و دیگر مشتقات متیل گزانتینی به طور گسترده در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و کشاورزی بکار برده می شوند. با توجه به اینکه

نتایج آزمایشات بیوترانسفورماسیون کافئین تحت شرایط سلول های در حال استراحت *Rhodotorula sp.* CW03 در این قسمت از مطالعه، تولید تیوفیلین و دیگر متابولیت های حاصل از بیوترانسفورماسیون کافئین، بوسیله سلول های در حال استراحت *Rhodotorula sp.* CW04 با استفاده از تکنیک های TLC و HPLC مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می شود، تیوفیلین با Rf ۰/۶۵ (کروماتوگرام TLC) و زمان بازدارندگی ۹/۴ دقیقه (کروماتوگرام HPLC) و پاراگزانتین با زمان بازدارندگی ۸/۳ دقیقه به عنوان دو متابولیت اصلی حاصل از تجزیه کافئین تشخیص داده شده است. در کشت های کنترل (حاوی ۲/۵ گرم در لیتر کافئین و بدون تلقیح مخمر) این متابولیتها ظاهر نشده است که نشان می دهد سوبسترای کافئین قابلیت تبدیل شدن در شرایط غیرزیستی را ندارد.



شکل ۳: کروماتوگرام های TLC و HPLC پس از ۷۲ ساعت واکنش بیوترانسفورماسیون کافئین بوسیله سلول های در حال استراحت *Rhodotorula sp.* CW04

A1: کروماتوگرام TLC ترکیبات متیل گزانتینی استاندارد (A: کافئین، B: تیوفیلین، C: تئوبرومین و D: پاراگزانتین). A2: کروماتوگرام TLC پس از ۷۲ ساعت واکنش بیوترانسفورماسیون (S: تیوفیلین استاندارد، Co: محیط کنترل (حاوی سوبسترای کافئین و بدون تلقیح مخمر)). B1: کروماتوگرام HPLC ترکیبات متیل گزانتینی استاندارد. B2: کروماتوگرام HPLC پس از ۷۲ ساعت واکنش بیوترانسفورماسیون. خطوط توپر (solid) مربوط به محیط بیوترانسفورم شده و نقطه چین (dot) مربوط به محیط کنترل (محیط بدون تلقیح مخمر)

درصد بعد از ۶۰ ساعت انکوباسیون می‌باشد، توسعه دادند (۲۲). تجزیه زیستی کافئین به‌وسیله سویه‌هایی از *Pseudomonas stutzeri* گزارش شده است که ۵۹ درصد از کافئین با غلظت ۱/۲g/lit بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون تجزیه شده است (۲۷). آشنگرف و همکاران نشان دادند که ۸۰/۲ درصد کافئین (با غلظت اولیه ۲/۵ گرم در لیتر) به‌وسیله *Pseudomonas pseudoalcaligenes strain TPS8* بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون تجزیه شده است (۳۰). علیرغم فراوانی تحقیقات صورت گرفته در ارتباط با کاهش یا حذف کامل کافئین از محیط‌های آلوده، در بیشتر مطالعات شرح داده شده مقادیر مناسبی از متابولیت‌های تنوفیلین و پاراگزانتین گزارش نشده است. مطالعه اخیر در راستای جداسازی و شناسایی مخمرهای بومی با قابلیت تجزیه‌کنندگی کافئین و امکان تشکیل تنوفیلین و پاراگزانتین انجام شده است. در این پژوهش، ۱۴ سویه مخمری با پتانسیل تجزیه‌کنندگی سوبسترای کافئین از نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شده در مناطق مختلف ایران جداسازی شدند. سویه‌های جدا شده از نظر توانایی بیوترانسفورماسیون کافئین به تنوفیلین و دیگر متیل‌گزانتین‌های با ارزش از طریق آنالیز TLC مورد ارزیابی قرار گرفتند. مسئله‌ای که انجام تکنیک TLC برای آنالیز متیل‌گزانتین‌ها را دشوار می‌ساخت شباهت ساختاری زیاد این ترکیبات به یکدیگر بود. در واقع برخی از این ترکیبات تنها در موقعیت یک گروه متیل با یکدیگر تفاوت داشتند. این امر موجب می‌شود اعضای این خانواده دارای قطبیت تقریباً مشابهی باشند و آنالیز TLC در مورد آن‌ها بسیار دشوار باشد. به همین دلیل به کمک تکنیک‌های دقیق‌تر مانند HPLC، تولید تنوفیلین و پاراگزانتین توسط سویه‌های مخمری مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس یافته‌های بدست آمده سویه CW03 (جدا شده از یک نمونه آب طبیعی با خاصیت درمانی جمع‌آوری شده از یکی از روستاهای استان کردستان) دارای بیشترین تولید تنوفیلین و پاراگزانتین بود. سویه مذکور براساس ویژگی‌های فنوتیپی و ژنتیکی تحت عنوان *Rhodotroula sp. CW03* شناسایی شد. توالی نوکلئوتیدی ژن ITS1-5.8S-ITS2 rDNA سویه CW03 با شماره دسترسی KF414531 در بانک NCBI قابل دسترسی است. در ادامه این مطالعه به منظور تعیین مقادیر کمی تنوفیلین و پاراگزانتین تولید شده از سوبسترای کافئین، آزمایشاتی تحت سلول‌های

حضور کافئین در رژیم غذایی انسان‌ها - از طریق انواعی از نوشیدنی‌ها و محصولات کافئین‌دار - دارای اثرات فیزیولوژیک زیان‌باری بوده و سلامت انسان‌ها را تهدید می‌کند. لذا دانشمندان تمرکز خود را روی یافتن سویه‌هایی میکروبی متمرکز کرده‌اند که بتوانند کافئین سمی را تجزیه و حذف کنند. در حالی که، بسیاری از انواع روش‌های فیزیکی و شیمیایی مانند استخراج با حلال‌های مختلف سمی مانند کلروفرم، اتیل‌استات و دی‌کلرومتان، نفوذ آب و همچنین استخراج دی‌اکسیدکربن فوق‌بحرانی برای کاهش سمیت کافئین استفاده شده است با این حال، این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی مانند عوارض جانبی به دلیل باقی‌مانده‌های حلال، از دست دادن طعم واقعی و هزینه‌های عملیاتی بالا می‌باشند از این رو جهت سم‌زدایی کافئین مناسب نمی‌باشند (۲۷). برای غلبه بر این مشکل به تازگی روش سازگار با محیط زیست (شیمی سبز) را که از سلول‌های میکروبی و یا آنزیم‌های آنها جهت تجزیه کافئین استفاده می‌کند، بکار می‌برند. با توجه به سمیت کافئین برای میکروارگانیسم‌ها جداسازی و شناسایی سویه‌هایی با قابلیت تجزیه‌کنندگی کافئین ما را قادر می‌سازد که سویه‌های کارآمدی به عنوان بیوکاتالیزور هم جهت حذف کافئین سمی و هم برای بیوترانسفورماسیون کافئین به متیل‌گزانتین‌های با ارزش مانند تنوفیلین، تنوبرومین و پاراگزانتین را جداسازی نماییم. بسیاری از محققان حذف کافئین از محلول‌ها را به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها نشان داده‌اند. در باکتری‌ها گونه‌های *Pseudomonas spp.* و در قارچ‌ها گونه‌های *Aspergillus spp.* و *Penicillium spp.* به طور کارآمدی کافئین را تجزیه می‌کنند (۲۸). اولین تجزیه میکروبی کافئین با استفاده از سویه‌هایی از *Penicillium roqueforti* و *Stemphyllum sp.* گزارش شده است (۱۳). با این حال گزارش‌ها حاکی از آن است که این گونه‌ها قادرند کافئین را در غلظت ۰/۱۹ گرم در لیتر بعد از ۲۹ ساعت انکوباسیون تجزیه کنند. یک سویه خاص از *Pseudomonas putida* که نسبت به کافئین مقاوم بود جداسازی شده و پس از بررسی‌های صورت گرفته بیش از ۹۵ درصد تجزیه کافئین با غلظت اولیه ۵ گرم در لیتر بعد از ۵۰ ساعت گزارش شد (۲۹). آشنگرف و همکاران فرآیند تجزیه کافئین را با استفاده از *Saccharomyces cerevisiae TFS9* که قادر به تجزیه کافئین در غلظت ۳/۵ گرم در لیتر با بازده ۸۴/۸

پارامترهای تاثیرگذار بر فرآیند بیوترانسفورماسیون کافئین و شناسایی ساز و کار مولکولی فرآیند مذکور با هدف جلوگیری از تجزیه بیشتر متیل گزانتین های تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی، بتوان کاربردی نمودن سویه مذکور را عملی ساخت.

نتیجه نهایی:

جداسازی و تعیین خصوصیت مخمرهای بومی تجزیه کننده کافئین می تواند تحقیقات هدفمندی را برای کاربردی کردن کاتالیزورهای میکروبی با هدف حذف زیستی کافئین از محیط های آلوده و نیز به عنوان افقی نو در تولید متیل گزانتین های با ارزش افزوده بالا بویژه تیوفیلین طبیعی از سویسترای ارزان قیمت کافئین ایجاد نماید.

سپاسگزاری:

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی ملکولی دانشگاه کردستان میباشد. بدینوسیله از حوزه معاونت آموزشی (مدیریت تحصیلات تکمیلی) که هزینه های طرح مزبور را تقبل نمودند تشکر و قدردانی می نمایم. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی باشد.

References

- Lorist MM, Tops M. Caffeine, fatigue, and cognition. *Brain Cogn* 2003; 53: 82-94.
- Hallstrom T, Wolk A, Glynn A, Michaelsson K. Coffee, tea and caffeine consumption in relation to osteoporotic fracture risk in a cohort of Swedish women. *Osteoporos Int* 2006; 17: 1055-64.
- Bezerra JP, da Silva LR, de Alvarenga Lemos VA, Duarte PM, Bastos MF. Administration of high doses of caffeine increase alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2008; 79: 2356-60.
- Smith A. Effects of caffeine on human behavior. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 1243-55.
- CARE Study Group. Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study. *BMJ* 2008; 337, a2332.
- Niea H, Zhangb G, Liua M, Dinga X, Huang a Y, Hu S. Efficacy of theophylline plus salmeterol/fluticasone propionate combination therapy in patients with asthma. *Respir Med* 2013; 107(3): 347-54.
- Chena YH, Yaoa WZ, Dinga YL, Gengb B, Lua M, Tangb CS. Effect of theophylline on endogenous hydrogen sulfide production in patients with COPD. *Pulm Pharmacol Ther* 2008; 21(1): 40-6.
- Bleula U, Bircher B, Judb RS, Kutter APN.

حال استراحت Rhodotroula sp. CW03 انجام شد. با توجه به مزایای استفاده از سلول های در حال استراحت به عنوان بیوکاتالیزور از جمله جلوگیری از تکثیر بیومس سلولی، جداسازی آسانتر محصول تولیدی، انجام پروسه بیوکانورژن تحت شرایط غیراستریل و تنظیم بیومس سلولی ورودی، محققان زیادی از استراتژی سلول های در حال استراحت برای بهبود پروسه های بیوترانسفورماسیون استفاده نموده اند (۲۶،۳۱). براساس نتایج بدست آمده از آنالیزهای HPLC، سلول های در حال استراحت سویه CW03 توانایی بیوترانسفورماسیون ۲/۵ گرم در لیتر سوبسترای کافئین را به ۳۸۰ میلی گرم در لیتر (با راندمان مولی ۱۶/۴ درصد) و ۸۸۰ میلی گرم در لیتر پاراگزانتین (با راندمان مولی ۳۷/۹ درصد) پس از گذشت به ترتیب ۷۲ و ۱۲۰ ساعت از آغاز واکنش بیوترانسفورماسیون را دارا می باشد. گرچه راندمان های مولی بدست آمده در این مطالعه برای محصولات حاصل از بیوترانسفورماسیون نسبتاً پایین است اما بایستی تاکید نمود که این راندمان ها تحت شرایط غیر بهینه شده حاصل شده است و در آینده امید است پس از شناسایی

- Respiratory and cardiovascular effects of doxapram and theophylline for the treatment of asphyxia in neonatal calves. *Theriogenology* 2010; 73(5): 612-9.
- Yano Y, Yoshida M, Hoshino S, Inoue K, Kida H, Yanagita M, Takimoto T, Hirata H, Kijima T. Anti-fibrotic effects of theophylline on lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341(3):684-90.
- Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 2005; 174(2): 589-94.
- Hawke1 TJ, Allen DG, Lindinger MI. Paraxanthine, a caffeine metabolite, dose dependently increases [Ca²⁺] ion in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2000; 89: 2312-17.
- Liese A, Seelbach K, Wandrey C. *Industrial Biotransformation*. 2nd ed. Weinheim; Wiley, 2006.
- Schwimmer S, Khurtzman RH, Heftmann E. Caffeine metabolism by *Penicillium roqueforti*. *Arch Biochem Biophys* 1971; 147 (1): 109-13.
- Ina K. Biochemical studies of caffeine. Degradation of caffeine by mold. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 1971; 45 (8): 378-380.
- Kurtzman RH, Schwimmer S. Caffeine removal from growth media by microorganisms. *Experimentia* 1971; 27(4): 481-2.

16. Asano Y, Komeda T, Yamada H. Microbial production of theobromine from caffeine. *Biosci Biotech Biochem* 1993; 57: 1286-9.
17. Mazzafera P, Olsson O, Sandberg G. Degradation of caffeine and related methyl xanthines by *Serratia marcescens* isolated from soil under coffee cultivation. *Microb Ecol* 1994;31:199-207.
18. Madyastha KM, Sridhar GR, Vadiraja BB, Madhavi YS. Purification and partial characterization of caffeine oxidase-A novel enzyme from a mixed culture consortium. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 460-4.
19. Brand D, Pandey A, Roussos S, Soccol CR. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid-state fermentation system. *Enzyme Microb Technol* 2000; 27: 127-33.
20. Sarath Babu VR, Patra S, Thakur MS, Karanth NG, Varadaraj MC. Degradation of caffeine by *Pseudomonas alcaligenes* CFR 1708. *Enzyme Microb Technol* 2005; 37: 617-22.
21. Lakshmi V, Nilanjana D. Biodegradation of caffeine by *Trichosporon asahii* isolated from caffeine contaminated soil. *Int J Eng Sci Technol* 2011; 3 (11): 7988-97.
22. Ashengroph M, Borchalvei M. *Saccharomyces cerevisiae* TFS9, a novel isolated yeast capable of high caffeine-tolerant and its application in bio-decaffeination approach. *Progress Biol Sci* 2013; 3: 145-56.
23. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
24. Kurtzman CP, Fell JW. *The yeasts: a taxonomic study* (4th revised and enlarged edition). Amsterdam: Elsevier, 2000.
25. Yamada Y, Makimura K, Mirhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55: 122-5.
26. Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F. *Candida galli* strain PGO6: a novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanillic acid. *Curr Microbiol* 2011; 62 (3): 990-8.
27. El-Mched, F, Olama, Z, Holail H. Optimization of the environmental and physiological factors affecting microbial caffeine degradation and its application in caffeinated products. *Basic Res J Microbiol* 2013; 1: 17-27.
28. Gokulakrishnan S, Chandraraj K, Gummadi SN. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme Microb Technol* 2005; 37 (2): 225-32.
29. Woolfolk CA. Metabolism of N-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. *J Bacteriol* 1975;123: 1088-1106.
30. Ashengroph M, Ababaf S. Biodecaffeination by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* TPS8, an isolated strain from tea plantation soil. *Islam Repub Iran J Sci* 2013; 24:305-312.
31. Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F. Conversion of isoeugenol to vanillin by *Psychrobacter* sp. strain CSW4. *Appl Biochem Biotechnol* 2012; 166 (1): 1-12.

*Original Article***Use of Resting Cells of Native Screened *Rhodotorula* sp. CW03 in Biotransformation of Caffeine to Theophylline and Paraxanthine**

M. Ashengroph, Ph.D.^{*}; M. Haidarizadeh, Ph.D.^{*}; M. Borchaluei, M.Sc.^{**}

Received: 24.1.2015

Accepted: 11.5.2015

Abstract

Introduction & Objective: In recent years, microorganisms have been applied as biocatalysts for making pharmaceutically natural products. Microbial biotransformation of caffeine suggests a dual approach for biodegradation of toxic caffeine from polluted environments and a method for the production of medically and pharmaceutically valuable dimethylxanthines. The present work describes the identification of native yeasts capable of biotransformation of caffeine into theophylline and paraxanthine.

Materials & Methods: In this experimental study fourteen yeast strains which were able to degrade caffeine isolated based on their morphology were selected as biocatalysts for biotransformation of caffeine as a low-cost substrate to high value added dimethylxanthines such as theophylline and theobromine. The selected strains were characterized based on phenotypic and genetic tests. Screening was performed by Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyses.

Results: The results obtained using TLC and HPLC analyses suggest formation of two main metabolites of theophylline and paraxanthine from biotransformation of caffeine under resting cells of *Rhodotorula* sp. CW03 (GenBank accession number KF414531). The results showed that under resting cell conditions a maximum concentration of theophylline 380 mg/l (molar yield of 16.4%) and paraxanthine 880 mg/l (molar yield of 37.9%) were obtained after 72 h and 120 h of conversion time, respectively.

Conclusion: In the current investigation, done for the first time in Iran, we describe the isolation and identification of yeast strains with caffeine degradation ability which can be proposed as safe and cost-effective biocatalysts in production of value added dimethylxanthines from caffeine as a low-cost substrate.

(*Sci J Hamadan Univ Med Sci* 2015; 22 (2): 83-92)

Keywords: Biotransformation / Caffeine / Dimethylxanthine / *Rhodotorula* / Theophylline

^{*} Assistant Professor, Department of Biological Sciences and Biotechnology, School of Sciences
Kurdistan University, Sanandaj, Iran. (m.ashengroph@uok.ac.ir)

^{**}M.Sc. in Molecular Cell Biology, School of Sciences, Kurdistan University, Sanandaj, Iran.