Archive of SID

مقاله پژوهشی

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

دکتر مراحم آشنگرف*، دکتر مسعود حیدری زاده*، مریم برچلویی**

دریافت: ۹۳/۱۱/۴ پذیرش: ۹۴/۲/۲۱

چکیده:

مقدمه و هدف: در سال های اخیر کاربرد میکروارگانیسم 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 تئوفیلین و پاراگزانتین انجام دهند.

روش کار: در این مطالعه تجربی ١٤ 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 تئوفیلین 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 (تئوفیلین و پاراگزانتین) حاصل از بیوترانسفورماسیون کافئین شد. در این واکنش بیوترانسفورماسیون، بیشترین مقادیر تئوفیلین (۳۸۰ میلی گرم در لیتر) با راندمان مولی ١٦/٤درصد 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 / تئوفیلین / دی متیل گزانتین / ردوتورولا / کافئین

مقدمه:

کافئین (۱و۳و۷ تری‌متیل‌گزانتین) یک ترکیب متیل گزانتینی مهم است که با فرمول شیمیایی $C_8H_{10}N_4O_2$ به خانواده‌ی آلکالوئیدهای پورینی که توسط گیاهان تولید می‌شوند تعلق دارد. کافئین یک ماده‌ی تحریک‌کننده‌ی روانی (روانگردان) است که باعث افزایش هوشیاری شده و با غلبه بر خستگی باعث حفظ تمرکز می‌شود (۱). علیرغم کاربرد گسترده کافئین در ساخت نوشیدنی‌هایی مثل چای، قهوه و تعداد زیادی نوشیدنی غیر الکلی، کافئین دارای اثرات جانبی بسیاری برای انسان می‌باشد و مصرف طولانی مدت آن باعث ایجاد سردرد، کوفتگی، تحریکات فوق‌کلیوی، نامنظمی فعالیت کلیوی، نامنظمی فعالیت ماهیچه‌ای، نامنظمی در فعالیت قلب، تپش قلب، ناراحتی‌های معده، اضطراب، لرزش بدن، افزایش سطح هموسیستئین پلاسما، افزایش فشارخون، بی‌خوابی و اغلب بیماری‌های حاد قلبی می‌شود (۴-۲). مصرف کافئین در دوران بارداری بر رشد جنین تاثیر منفی می‌گذارد و احتمال ناهنجاری‌ها و سقطهای خودبه‌خودی را افزایش

* 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 جانبی‌کافئین، 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 تجزیه کننده کافئین را به خوبی توجیه می‌سازد. کافئین در مقایسه با دی متیل گزانتین های دیگر از جمله تئوفیلین، پاراگزانتین و تئوبرومین به علت داشتن‌یک گروه متیل اضافی دارای خاصیت تحریکی زیاد همراه با اثرات زیان‌آور برای سلامتی می‌باشد. برداشت گروه‌های متیل اثرات زیان‌آور مولکول‌کافئین را کاهش داده‌و خواص‌درمانی 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 آنتی اکسیدان می‌باشند. امروزه از تئوفیلین (۱و۳ دی‌متیل-گزانتین) برای درمان بیماری‌های تنفسی مانند انسداد ریوی مزمن (Chronic obstructive pulmonary disease) و آسم استفاده‌ی فراوان می‌شود (۶،۷). عملکردهای اصلی تئوفیلین در بدن شامل شل‌کردن 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 مکانیزم‌های 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 (۱و۷ دی‌متیل‌گزانتین) با فرمول شیمیایی $C_7H_8N_4O_2$ اصلی ترین 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 باعث انتقال یون‌های کلسیم به بافت ماهیچه‌ی اسکلتی می‌شود (۱۱).

با توجه به شباهت ساختاری بین کافئین و مشتقات متیل گزانتینی، در دو دهه گذشته مطالعات قابل توجهی با هدف استفاده از میکروارگانیسم ها به عنوان بیوکاتالیزورهای مبتنی بر شیمی سبز برای تجزیه زیستی و بیوترانسفورماسیون میکروبی سوبسترای ارزان قیمت کافئین به انواع متیل‌گزانتین های با ارزش مانند تئوفیلین، تئوبرومین و پاراگزانتین صورت گرفته است (۱۲،۱۳). بیوترانسفورماسیون کافئین توسط سویه های میکروبی مختلف از جمله Penicillium roqueforti (۱۳)، Aspergillus niger (۱۴)، Stemphylium sp. (۱۵)، Pseudomonas putida (۱۶)، Serratia marcescens (۱۷)، کشت مخلوط Klebsiella و Rhodococcus (۱۸)، Rhizopus delemar (۱۹)، Pseudomonas alcaligenes (۲۰) و Trichosporon asahii (۲۱) گزارش شده است. محتوی آنزیمی بالا و فعال بودن مسیرهای متابولیسمی متعدد در مخمرها یکی از ویژگی‌های برجسته‌ای است که این میکروارگانیسم ها را به ابزاری مناسب برای مطالعات بیوترانسفورماسیون میکروبی تبدیل نموده است و لذا این مطالعه با هدف جداسازی مخمرهای بومی تجزیه کننده کافئین، شناسایی فنوتیپی و ژنتیکی سویه برتر و بررسی امکان تولید تئوفیلین و پارازانتین از واکنش بیوترانسفورماسیون کافئین تحت شرایط سلول های در حال استراحت به عنوان بیوکاتالیزور انجام شده است.

روش کار:

مواد و محیط های کشت: در این مطالعه تجربی برای انجام آزمایشات بیوترانسفورماسیون از کافئین، تئوبرومین و تئوفیلین با خلوص بالای ۹۹ درصد و پاراگزانتین با خلوص بالای۹۸ 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 محیط های سنتتیک YPD (Yeast Peptone Dextrose) از مرک، آلمان خریداری شد. آگار جهت جامد کردن محیط های کشت از شرکت

www.SID.ir

Archive of SID

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 دیفکو (Detroit, MI, USA) و مرک خریداری شد. آنزیم Taq پلیمراز، نوکلئوتیدها و سایر مواد واکنش دهنده در PCR، از سیناژن تهیه شد. پرایمرهای ITS1 و ITS4 جهت شناسایی سویه های مخمری از شرکت فزاپژوه خریداری شد.

نمونه برداری و غنی سازی سویه های مخمری: نمونه‌های مورد آزمایش از خاک‌های زیر کشت چای و پساب کارخانه های تولید کننده چای مناطق شمال کشور و همچنین از خاک‌ها، آب رودخانه‌ها و آب‌های درمانی استان‌هایی از کشور مانند کردستان، کرمانشاه، همدان، اهواز، اصفهان، بوشهر و شیراز جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها در ظروف استریل جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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، ۰/۰۰۲ 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 شیشه‌ای سر کج استریل، به صورت چمنی کشت داده و برای مدت ۵ روز در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بعد از آن کلنی‌های 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 کلنی‌ها خالص شوند. سویه های خالص شده جهت نگهداری به محیط های اسلنت دار انتقال داده شدند. نمونه‌هایی که بر روی محیط کشت حاوی کافئین قابلیت رشد داشتند برای بررسی پتانسیل تجزیه کنندگی کافئین (رشد بر روی محیط کشت نمکی حاوی کافئین 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: $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g/l; $CaCl_2$ 0.015 g/l; $FeSO_4.7H2O$ 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. سویه‌های 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 سویه‌هایی 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 سویه‌های مخمری با قابلیت تجزیه کنندگی کافئین، در محیط YPD براث (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 پالایه‌های غشایی میلی‌پور۰/۲۲ میکرونی، به محیط افزوده شد. پس از طی ۴۸ ساعت گرم خانه‌گذاری اضافی، ابتدا کل مایع رویی از بیومس سلولی با استفاده از سانتریفیوژ کردن (۳۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه) جدا گردید سپس با استفاده از اسیدسولفوریک ۱۰ نرمال به دقت اسیدی شد تا تئوفیلین و دیگر گزانتین‌های احتمالی‌تشکیل‌شده در مخلوط واکنش بیوترانسفورماسیون به شکل آزاد خود درآیند. پس از آن هم حجم مایع رویی، اتیل‌استات اضافه شد. فاز آبی از فاز آلی با استفاده از سانتریفیوژ کردن (۳۰۰۰×g به مدت ۱ دقیقه) جدا شد. سپس ۵ میکرولیتر از فاز اتیل‌استاتی جمع‌آوری شده با استفاده از فاز متحرک بوتانل/اسیداستیک/آب با نسبت حجمی ۱:۱:۴ 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 کورتزمن انجام‌شد (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 DNAی ژنومی سویه ی مخمری CW03 ، با استفاده از دو پرایمر همه گانی ITS1 (forward primer: 5´-tccgtaggtgaacctgcgg-3´) و ITS4 (reverse primer: 5´-tcctccgcttattgatatgc-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 آشنگرف و همکارانش شناسایی‌شد (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 کافئین تحت سلول های در حال استراحت سویه مخمری CW03: سویه ی مخمری CW03 که براساس آنالیز TLC دارای پتانسیل تبدیل کنندگی کافئین 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 داده‌شد (ساعت ۳۰ ام). پس از برداشت سلولها و شستشوی آنها در محیط بافر نمکی ($Na_2HPO_4.12H_2O$ 1.5 mg/ml, KH_2PO_4 0.3 mg/ml, NH_4Cl 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 کافئین برای مطالعات بیوترانسفورماسیون استفاده شد (۲۶). با هدف شناسایی متابولیت های اصلی حاصل از بیوترانسفورماسیون کافئین، آنالیز HPLC انجام شد. سنجش کمی میزان متیل گزانتین های ایجاد شده از بیوترانسفورماسیون کافئین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، مجهز به آشکارساز جذبUV انجام شد. در دستگاه HPLC از ستون نوع C18 (اندازه قطر ذرات فاز ثابت ۵ میکرون) به طول ۲۵ سانتیمتر و قطر داخلی۴/۶ میلی‌متر استفاده شد. نوع فاز متحرک به کار گرفته شده مخلوطی از آب و متانول به نسبت۸۰ به ۲۰ بود که به صورت ایزوکراتیک با سرعت ۱ml در دقیقه روی ستون فرستاده شد. طول موج استفاده شده ۲۷۸ nm و حجم تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود.

نتایج:

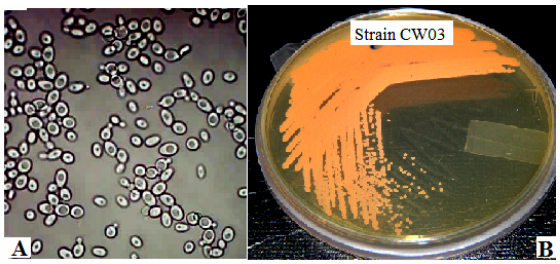
غربال گری مخمرهای با پتانسیل تبدیل زیستی کافئین به تئوفیلین: هدف از انجام این مطالعه عبارت بود از جداسازی و تشخیص سویه های مخمری با پتانسیل تجزیه کنندگی کافئین. در این راستا، ۵۳ سویه مخمری که براساس تکنیک غنی‌سازی غربالگری شده بودند در محیط M9-caffeine agar حاوی ۲/۵ گرم در لیتر کافئین به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن کشت داده شدند که براساس نتایج بدست آمده ۱۴ سویه قابلیت رشد در محیط مذکور را دارا بودند. قابلیت بیوترانسفورماسیون سوبسترای کافئین 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 کافئین 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 ماکروسکوپی، دارای کلنی به رنگ قرمز تا صورتی بوده و از نظر میکروسکوپی به صورت تک سلولی و فاقد ریسه بوده، به شکل کروی یا بیضوی های منفرد، دوتایی و یا گروهی دیده می‌شوند و معمولاً با جوانه زدن تکثیر می یابند.

www.SID.ir

Archive of SID

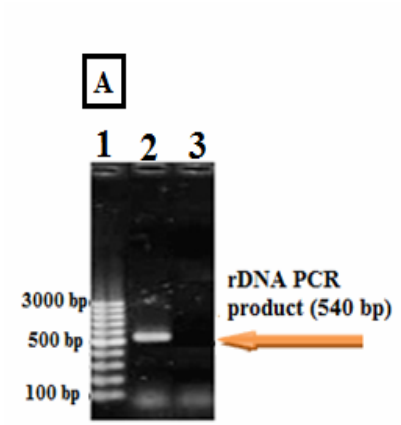
پس از شناسایی اولیه سویه ی مخمری CW03 براساس مشاهدات مورفولوژیک و آزمایشات بیوشیمیایی متداول، جهت تعین هویت دقیق سویه CW03، شناسایی فیلوژنتیکی انجام شد. نتایج حاصل از شناسایی ملکولی با توالی حاصل از تکثر ناحیه ژنی با پرایمرهای ویژه در شکل ۲ آمده است. براساس نتایج بدست آمده سویه مخمری CW03 تحت نام Rhodotorula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



شکل ۱: ویژگی‌های مورفولوژیک و کشتی سویه مخمری CW03

A: تصویر میکروسکوپ نوری (با بزرگنمایی ۴۰۰) از سویه مخمری پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در محیط کشت YPD براث و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد

B: سویه مخمری خالص شده در محیط کشت YPD آگار پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد



B

TGAATTATAGGGCGTCTACTTGTAGAGCCTGACCTCCACTTCTAAC
ACTGTGCCTTGATGGCGAGGTAATGGAAACTTTTCNCGAGTGAAAC
TACCTTGCGGCTTCATTTTAAACATTAGTTAAAGTATGTAACGAAAT
ATCGAAACAAAAAAAGACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCA
GAATTCAGTGAATCTCGAATCTTTGACGCACCTTGCGCTCCCTGGTA
TTCCGGGGAGCATGCCTTTTTGAGTGTCATGAACTCTTCAACCCACC
AGTTTCTAGTAGACTGCGTTGGTGTTTGGATTTTGAGCGTTGCTAGT
CTGACTAGCTCGTTCGTAATATATTAGCATCTCTAATTCGAATTCGA
TTGACTCAGTGTAATAGACTATTGGCTGAGGACACTTTTNATTNGT
GGCCGTACTAGAACCAGTAGAAGCTTCCAACTATTGTAGTCAACTT
TAATTTAGACCTCGATCAGGCCGGATTA

C

Accession number	Description	E-value	Similarity (%)
KF414531	Rhodotorula sp. CW03; ITS1 (partial sequence), 5.8S rRNA and ITS2 (complete sequence) and complete sequence 28S ribosomoal RNA gene.	Sequence	strain CW03
HM545717	Rhodotorula sp. USM-PSY62; 18S ribosomal RNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA and ITS2 (complete) and partial sequence 28S rRNA.	0	97
JQ857037	Rhodotorula glacialis isolate T11RS; ITS1 (partial), 5.8S ribosomal RNA gene (complete sequence) and partial sequence Internal transcribed spacer 2.	0	96
AM922291	Rhodotorula sp. YSAR13; 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial sequence).	0	96
AM410637	Zymoxenogloea sp. SS-4A; partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and partial 26S rRNA gene, strain 4A.	0	96
EF151245	Rhodotorula psychrophila strain PB15; 18S ribosomal RNA gene (partial sequence), Internal transcribed spacer 1, 5.8S rRNA gene and ITS2 (complete).	0	96
AB774464	Rhodotorula sp. NHT-2; 18S rRNA, ITS1, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: NHT-2.	0	96
EF151249	Rhodotorula glacialis strain A19; 18S rRNA and 28S rRNA (partial sequence), ITS1, 5.8S ribosomal RNA gene and ITS2 (complete sequence).	0	96
KC333169	Rhodotorula psychrophenolica 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 مخمری 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 مخمری CSW03، لاین ۳ کنترل منفی

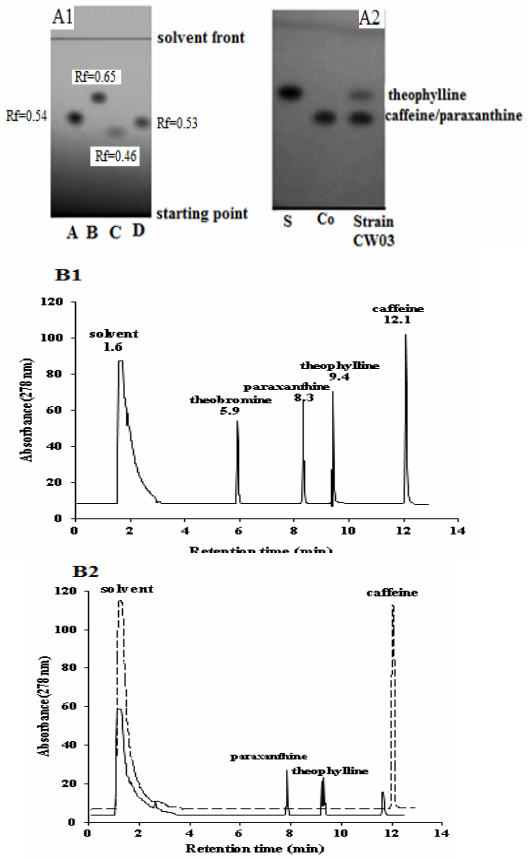
B: توالی نوکلئوتیدی ژنهای نواحیrDNA ITS1–5.8S–ITS2 سویه مخمری CW03 ثبت شده با شماره دسترسی KF414531 در پایگاه اطلاعات ژنی NCBI

C: نتایج حاصل از بلاست کردن سویه مخمری CW03 و ۸ سویه مخمری بدست آمده از بانک ژنی در سایت اینترنتی NCBI

www.SID.ir

Archive of SID

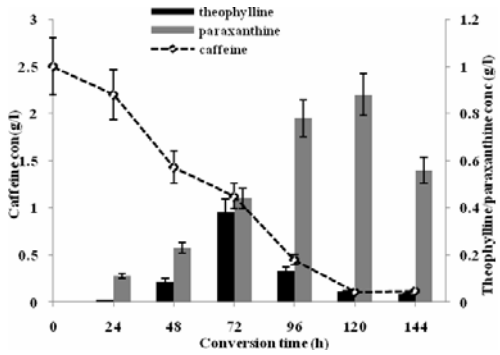
نتایج آزمایشات بیوترانسفورماسیون کافئین تحت شرایط سلول های در حال استراحت Rhodotorula sp. CW03: در این قسمت از مطالعه، تولید تئوفیلین و دیگر متابولیت های حاصل از بیوترانسفورماسیون کافئین، بوسیله سلول های در حال استراحتRhodotorula sp. CW04 با استفاده از تکنیک های TLC و HPLC مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می شود، تئوفیلین 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: تئوفیلین، C: تئوبرومین و D: پاراگزانتین). A2: کروماتوگرام TLC پس از ۷۲ ساعت واکنش بیوترانسفورماسیون (S: تئوفیلین 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)

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 ۲۴ساعت اولیه از شروع واکنش بیوترانسفورماسیون، کافئین شروع به تجزیه شدن نموده (حدود ۱۲ درصد) و مقادیر کمی تئوفیلین (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 تئوفیلین (۳۸۰ میلی گرم در لیتر) با راندمان مولی ۱۶/۴درصد 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 تئوفیلین مشاهده شد که احتمالاً به دلیل واکنشهای دی متیلاسیون بوده و منجر به متابولیزه شدن بیشتر تئوفیلین 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 به‌طور گسترده در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و کشاورزی بکار برده می‌شوند. با توجه به اینکه

www.SID.ir

Archive of SID

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 فوق بحرانی 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 تجزیه کنندگی کافئین ما را قادر می‌سازد که سویه‌های کارآمدی به عنوان بیوکاتالیزور هم جهت حذف کافئین سمی و هم برای بیوترانسفورماسیون کافئین به متیل گزانتین های با ارزش مانند تئوفیلین، تئوبرومین و پاراگزانتین را جداسازی نماییم. بسیاری از محققان حذف کافئین از محلول‌ها را به‌وسیله میکرواورگانیسم‌ها نشان‌داده‌اند. 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 .Stemphylum 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 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 درصدکافئین (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 محیط های آلوده، در بیشتر مطالعات شرح داده شده مقادیر مناسبی از متابولیت های تئوفیلین و پاراگزانتین گزارش نشده است. مطالعه اخیر در راستای جداسازی و شناسایی مخمرهای بومی با قابلیت تجزیه کنندگی کافئین و امکان تشکیل تئوفیلین و پاراگزانتین انجام شده است. در این پژوهش، ۱۴ سویه مخمری با پتانسیل تجزیه کنندگی سوبسترای کافئین از نمونه های مختلف جمع آوری شده در مناطق مختلف ایران جداسازی شدند. سویه های جدا شده از نظر توانایی بیوترانسفورماسیون کافئین به تئوفیلین و دیگر متیل گزانتین های با ارزش از طریق آنالیز TLC مورد ارزیابی قرار گرفتند. مسئله‌ای که انجام تکنیک TLC برای آنالیز متیل گزانتین‌ها 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 تئوفیلین و پاراگزانتین توسط سویه های مخمری مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس یافته های بدست آمده سویه CW03 (جدا شده از یک نمونه آب طبیعی با خاصیت درمانی جمع آوری شده از یکی از روستاهای استان کردستان) دارای بیشترین تولید تئوفیلین و پاراگزانتین بود. سویه مذکور براساس ویژگی های 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 تئوفیلین و پاراگزانتین تولید شده از سوبسترای کافئین، آزمایشاتی تحت سلول های در

www.SID.ir

Archive of SID

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 تئوفیلین (با راندمان مولی ۱۶/۴ درصد) و ۸۸۰ میلی گرم درلیتر 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 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 می‌تواند تحقیقات هدفمندی را برای کاربردی کردن کاتالیست های 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 تئوفیلین طبیعی از سوبسترای 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 نماییم. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی باشد.

References

1. Lorist MM, Tops M. Caffeine, fatigue, and cognition. Brain Cogn 2003; 53: 82–94.
2. 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.
3. 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.
4. Smith A. Effects of caffeine on human behavior. Food Chem Toxicol 2002; 40: 1243–55.
5. CARE Study Group. Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study. BMJ 2008; 337, a2332.
6. Niea H, Zhangb G, Liua M, Dinga X, Huanga Y, Hu S. Efficacy of theophylline plus salmeterol/fluticasone propionate combination therapy in patients with asthma. Respir Med 2013; 107(3): 347–54.
7. 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.
8. Bleula U, Birchera B, Judb RS, Kutter APN. Respiratory and cardiovascular effects of doxapram and theophylline for the treatment of asphyxia in neonatal calves. Theriogenology 2010; 73(5): 612–9.
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.
10. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. J Immunol 2005; 174(2): 589–94.
11. Hawke1 TJ, Allen DG, Lindinger MI. Paraxanthine, a caffeine metabolite, dose dependently increases [Ca^{2+}] ion in skeletal muscle. J Appl Physiol 2000; 89: 2312–17.
12. Liese A, Seelbach K, Wandrey C. Industrial Biotransformation. 2nd ed. Weinheim; Wiley, 2006.
13. Schwimmer S, Khurtzman RH, Heftmann E. Caffeine metabolism by Penicillium roqueforti. Arch Biochem Biophys 1971; 147 (1): 109–13.
14. Ina K. Biochemical studies of caffeine. Degradation of caffeine by mold. Nippon Nogeikagaku Kaishi 1971; 45 (8): 378-380.
15. Kurtzman RH, Schwimmer S. Caffeine removal from growth media by microorganisms. Experimentia 1971; 27(4): 481-2.

www.SID.ir

Archive of SID

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, Borchaluei 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, MomenbeikF. Conversion of isoeugenol to vanillin by Psychrobacter sp. strain CSW4. Appl Biochem Biotechnol 2012; 166 (1): 1-12.

www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir