Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 36, No. 4, Oct. – Nov. 2014, Pages: 14-23

Isolation of *Bacillus Subtilis* CTB04 as A New Biocatalyst for the Synthesis of Paraxanthine and Theobromine from Caffeine Substrate

Morahem Ashengroph*, Sajad Ababaf

Department of Biological Sciences and Biotechnology, School of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Received: 8 Apr, 2014 Accepted: 3 May, 2014

Abstract

Background and Objectives: Microorganisms are known as an important biocatalysts for green chemistry which can be used beneficially for production of medically and pharmaceutically important compounds such as the bromine and paraxanthine through caffeine biotransformation. The aim of this study was to determine the bacterial subtypes which are able to use as a new biocatalyst for the synthesis of high-value added dimethylxanthines from caffeine as low-cost substrate.

Material and Methods: In this experimental study, twenty-one bacterial strains isolated according to their ability to degrade caffeine using enrichment technique. Primary screening was performed by Thin Layer Chromatography (TLC). The selected strain characterized based on phenotypic analysis and also amplification of 16S rDNA gene. Biotransformation mixtures were quantified for produced methylxanthines by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique.

Results: Among the 21caffeine-degrading bacterial cultures, the resting cells of *B. subtilis* strain CTB04 are reported to be able to convert caffeine into the bromine and paraxanthine. The results showed that the strain CTB04 was capable of converting 2.5 g/l of caffeine to 1.35 g/l paraxanthine with molar yield (58.2%) and 0.66 g/l of the bromine with a 28.4% molar yield after 96 h biotransformation.

Conclusion: There was a dual approach for bioremediation of the toxic caffeine from environment and a way for the production of pharmaceutically dimethylxanthines such as the bromine and paraxanthine as well.

Keywords: Biotransformation, Theobromine, Paraxanthine, Caffeine, *Bacillus Subtilis* CTB04

*Corresponding author:
Email: m.ashengroph@uok.ac.ir

مقاله پژوهشی

جداسازی *Bacillus subtilis* CTB04 و معرفی آن به عنوان یک بیوکاتالیزور جدید برای سنتز زیستی پارازانتین و تئوبرومین از سوبسترای کافئین

مراحم آشنگرف[۱]*، سجاد عباباف[۲]

[۱،۲] گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

دریافت: ۹۳/۱/۱۹ پذیرش: ۹۳/۲/۱۳

چکیده

زمینه و اهداف: استفاده از میکروارگانسیم‌های تجزیه کننده‌ی کافئین به عنوان کاتالیزورهای مبتنی بر شیمی سبز از منظر بیوترانسفورماسیون میکروبی جهت تولید محصولات باارزشی مانند تئوبرومین و پارازانتین که در صنایع دارویی و پزشکی کاربرد فراوانی دارند، حائز اهمیت است. این مطالعه با هدف تشخیص سویه‌های باکتری بومی تجزیه کننده‌ی کافئین به عنوان کاتالیست‌های زیستی نوین در تولید دی‌متیل زانتین‌های با ارزش افزوده‌ی بالا از سوبسترای ارزان قیمت کافئین انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۱ سویه‌ی باکتری با توان بالقوه‌ی تجزیه کنندگی کافئین براساس تکنیک غنی‌سازی جداسازی شدند. غربالگری اولیه از طریق کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) انجام شد. سویه منتخب با استفاده از آزمایش‌های فنوتیپی و همچنین آنالیز ژنوتیپی ژن 16S rDNA شناسایی شد. غلظت متیل‌زانتین‌های تولید شده در مخلوط واکنش بیوترانسفورماسیون به وسیله کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مورد سنجش کمی قرار گرفت.

یافته‌ها: براساس نتایج بدست آمده، از میان ۲۱ سویه باکتری غربالگری شده با قابلیت تجزیه کنندگی کافئین، سلول‌های در حال استراحت سویه باکتری Bacillus subtilis CTB04، دارای پتانسیل تبدیل کنندگی کافئین به تئوبرومین و پارازانتین بود. سویه CTB04 پتانسیل تبدیل ۲/۵ گرم در لیتر از سوبسترای کافئین را به ۱/۳۵ گرم در لیتر پارازانتین (راندمان مولی ۵۸/۲ درصد) و ۰/۶۶ گرم در لیتر تئوبرومین (راندمان مولی ۲۸/۴ درصد) را پس از گذشت ۹۶ ساعت از شروع واکنش بیوترانسفورماسیون دارا بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه راهکاری دومنظوره را هم برای پاک‌سازی زیستی کافئین سمی از محیط‌های آلوده و هم برای تولید دی متیل‌زانتین‌های های تئوبرومین و پارازانتین با کاربرد درمانی ارائه می‌کند.

کلید واژه‌ها: بیوترانسفورماسیون، تئوبرومین، پارازانتین، کافئین، Bacillus subtilis CTB04

* ایمیل نویسنده رابط: m.ashengroph@uok.ac.ir

مقدمه

متیل‌زانتین‌ها (methylxanthine) گروهی از ترکیبات آلی و دارای ساختار دو حلقه‌ای (مشابه بازهای پورینی) هستند که تعدادی گروه متیل نیز بر روی این حلقه‌ها قرار گرفته‌اند. اعضای این خانواده شامل کافئین (caffeine)، تئوفیلین (theophylline)، تئوبرومین (theobromine)، پارازانتین (paraxanthine) و چند ترکیب دیگر هستند که هر یک از متیل‌زانتین‌ها دارای اهمیت پزشکی خاصی است که باعث شده است که بیوتکنولوژیست‌ها همواره به مطالعه‌ی این ترکیبات و ایجاد روش‌های جدید برای

تولید کارآمد آن‌ها علاقه‌مند باشند (۱). پارازانتین (۱و۷ دی‌متیل-زانتین) با فرمول شیمیایی C7H8N4O2 اصلی‌ترین متابولیت مسیر کاتابولیسم کافئین در انسان است به طوری که ۸۰ درصد کافئین در کبد به پارازانتین تجزیه می‌شود (۲). این ترکیب از لحاظ ساختاری شبیه کافئین بوده و مانند کافئین یک محرک سیستم عصبی است. پارازانتین در گیاهان تولید نمی‌شود و فقط به عنوان یکی از حدواسط‌های مسیر کافئین در حیوانات دیده شده است. پارازانتین در بدن باعث مهار سنتز لکوترین‌ها (Leukotrienes) شده و از این طریق واکنش‌های التهابی و همچنین ایمنی ذاتی را سرکوب می‌کند (۳). یکی از مکانیزم‌های عمل پارازانتین عملکرد آنتاگونیستی آن برای گیرنده‌های آدنوزین است و همچنین این ترکیب با مهار آنزیم فسفودی‌استراز باعث افزایش غلظت cAMP درون سلولی می‌شود (۱). با وجود اینکه پارازانتین عمده‌ترین متابولیت کافئین در انسان است ولی توجه زیادی در تحقیقات علمی به آن نشده است. یکی از ویژگی‌های پارازانتین عملکرد انرژی‌زایی آن است به طوری که باعث افزایش غلظت اسیدهای چرب موجود در پلاسما می‌شود. پارازانتین همچنین با تحریک فعالیت پمپ سدیم/پتاسیم باعث انتقال یون‌های کلسیم به بافت ماهیچه‌ی اسکلتی می‌شود (۴). تئوبرومین (۳ و ۷ دی‌متیل‌زانتین) با فرمول شیمیایی C7H8N4O2 یک آلکالوئید است که منبع اصلی آن گیاه کاکائو می‌باشد ولی به میزان کمتری در چای و حتی توت هم وجود دارد. این ترکیب جزو خانواده‌ی متیل زانتین‌ها طبقه‌بندی شده و فقط یک گروه متیل نسبت به کافئین کمتر دارد. اثرات تئوبرومین بر روی سیستم عصبی انسان مشابه با کافئین ولی اندکی ضعیف‌تر است. سنتز تئوبرومین با متیلاسیون زانتوزین توسط یک آنزیم متیل‌ترانسفراز صورت می‌گیرد که گروه متیل را از S-آدنوزیل متیونین دریافت می‌کند. یکی از مهمترین کاربردهای تئوبرومین که باعث شده این ترکیب در فرآیندهای بیوتکنولوژیک به یک محصول هدف باارزش تبدیل شود، اثرات مثبت دارویی آن است. مطالعات نشان می‌دهد تئوبرومین به عنوان یک ترکیب ادرار آور و محرک عضلات قلبی عمل کرده و در درمان پروستات مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). تئوبرومین از دفع داروی دوکسوروبیسین (doxorubicin) توسط سلول های توموری ممانعت به عمل آورده که در نتیجه این عملکرد غلظت داروی مذکور در سلول‌های توموری افزایش یافته و بدین ترتیب تاثیر ضد توموری این دارو افزایش می‌یابد (۶). تئوبرومین همچنین در درمان تصلب شرائین، آنژین قلبی، فشار خون و سرفه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷). کافئین (۱و۳و۷ تری‌متیل‌زانتین) یک آلکالوئید تجاری مهم است که با فرمول شیمیایی C8H10N4O2 به خانواده‌ی آلکالوئیدهای پورینی که توسط گیاهان تولید می‌شوند تعلق دارد (۸). حضور کافئین در خاک می‌تواند بر روی حاصلخیزی خاک اثر بگذارد زیرا از جوانه زنی و رویش بذرها جلوگیری می‌کند. پسآب‌های حاوی کافئین اغلب به آب‌های مجاور راه می‌یابند و متعاقباً باعث افزایش غلظت کافئین در آب‌های سطحی و زیر زمینی می‌شوند. بنابراین برای رهایی آب‌ها و خاک از این سموم، حذف کافئین از این پسمانده ها یک مرحله‌ی بسیار ضروری در پردازش زباله‌های قهوه و چای است (۹). حذف کافئین از پوست و تفاله‌ی قهوه از سوی دیگری نیز باارزش است، زیرا این محصولات سرشار از پروتئین و کربوهیدرات می‌باشند و حذف کافئین از آن‌ها باعث افزایش کارایی آن‌ها شده و موجب می‌شود که بتوان از آن‌ها به عنوان خوراک دام، همچنین به عنوان یک سوبسترای مناسب و ارزان قیمت برای تولید اتانول، آنزیم‌ها و اسیدهای آلی استفاده کرد. 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. بنابراین لزوم حذف زیستی کافئین کاملا ضروری است (۱۰ و ۱۱). علاوه بر فرآیند حذف زیستی کافئین توسط میکروارگانیسم‌ها، می‌توان پا را یک قدم جلوتر نهاد و عنوان کرد که سویه‌های میکروبی وجود دارند که به دلیل محتوی آنزیمی مناسب می‌توانند کافئین (با ارزش اقتصادی پایین) را با انجام واکنش‌های زیست‌تبدیلی به گروهی از ترکیبات مشابه یعنی تئوفیلین، تئوبرومین و پارازانتین (دارای ارزش اقتصادی بالا و کاربردهای مختلف) تبدیل کنند. استفاده از میکروارگانیسم‌ها به منظور حذف کافئین از محیط و مواد غذایی کافئین‌دار می‌تواند بسیاری از مشکلات درمانی و زیست محیطی ناشی از حضور بیش از حد کافئین را مرتفع سازد و با صرف هزینه‌ی بسیار کمتری نسبت به روش‌های سنتی این ترکیب را تجزیه کند. همچنین استفاده از میکروارگانیسم ها در بیوترانسفورماسیون کافئین به تئوبرومین و پارازانتین می‌تواند مسیری ایمن و ارزان برای تبدیل یک ترکیب کم ارزش به ترکیب با ارزش افزوده‌ی بالا باشد. قیمت تمام شده‌ی کافئین در بازار بسیار پایین تر از ترکیباتی مانند تئوبرومین و پارازانتین است. در واقع فرآیند بیوترانسفورماسیون این امکان را فراهم می‌سازد تا کافئین را به ترکیباتی باارزش افزوده‌ی بالاتر تبدیل کرد که این امر می‌تواند از لحاظ اقتصادی صرفه جویی‌هایی را به دنبال داشته باشد. در این پژوهش جداسازی و شناسایی سویه های باکتری تجزیه کننده‌ی کافئین با توان بالقوه‌ی تبدیل زیستی سوبسترای کافئین به متیل زانتین های باارزش مانند تئوبرومین و پارازانتین تحت شرایط سلول های در حال استراحت (resting cells) مورد مطالعه قرار گرفته است و برای اولین بار توان بالقوه‌ی سویه‌ی بومی غربالگری شده‌ی Bacillus subtilis CTB04 به عنوان یک بیوکاتالیزور جدید برای سنتز زیستی پارازانتین و تئوبرومین از سوبسترای کافئین گزارش شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

کافئین، تئوبرومین و تئوفیلین با خلوص بالای ۹۹ درصد و پارازانتین با خلوص بالای ۹۸ درصد از شرکت سیگما- آلدریچ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) خریداری شد. متانول با درجه خلوص بسیار بالا مخصوص دستگاه HPLC از شرکت مرک تهیه شد (E.Merck, Darmstadt, Germany). صفحات کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) آلومینیومی با فاز ثابت سیلیکاژل 60F254 از شرکت مرک آلمان تهیه شد. اغلب مواد استفاده شده در واکنش

زنجیره ای پلیمرآز از شرکت سیناژن (Cinnagen company, Iran) تهیه شد. سایر مواد شیمیایی استفاده شده با درجه خلوص بالا بودند.

جمع آوری نمونه ها و تکنیک غنی سازی

با توجه به هدف پژوهش مناسب‌ترین مکان برای نمونه‌گیری خاک‌های زیر کشت چای در استان‌های شمالی بود که برای این منظور از ۱۵ مزرعه کشت چای نمونه‌هایی جمع‌آوری شد. برای افزایش تنوع درسویه‌های میکروبی مورد مطالعه، از رودخانه‌های جنوب کشور مانند کارون و همچنین برخی چشمه‌های درمانی استان کردستان نمونه‌گیری به عمل آمد. خاک معادن نقره و آهن در شهرستان قروه (استان کردستان) یکی دیگر از محل‌های هدف به منظور نمونه‌گیری بود. نمونه‌های آبی و نمونه‌های خاکی در ظرف های استریل جمع‌آوری شد. ابتدا سوسپانسیونی از نمونه-های جمع آوری شده (برای نمونه‌های خاک ۱ گرم و نمونه های آب ۱۰ میلی‌لیتر) در ارلن‌های حاوی ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه شد. سپس ۱ درصد از سوسپانسیون میکروبی فوق به ارلن-های ۱۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر از محیط نمکی M9 (۱۲) که به آنها غلظت مشخصی از کافئین (۲/۵ گرم در لیتر) به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، پس از استریل کردن از طریق پالایه‌های غشایی میلی‌پور با قطر سوراخ ۰/۲۲ میکرونی افزوده شده بود، استفاده شد. پس از غنی سازی و چندین بار پاساژ متوالی در این محیط‌ها، تنها باکتری‌های قادر به رشد بر روی کافئین باقی می-مانند. محیط‌های مذکور در دمای محیط بر روی شیکر با دور ۱۵۰rpm انکوبه شدند. از پاساژهای نهایی به میزان ۲۰۰ میکرولیتر روی محیط‌های نمکی آگاردار حاوی ۲/۵ گرم در لیتر کافئین پخش شده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی-گراد انکوبه شدند. بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت سویه‌هایی که دارای مورفولوژی مختلف بودند نشانه‌گذاری شدند. هرکدام از سویه-هایی که در مرحله قبل مشخص شده بودند به پلیت جداگانه‌ی انتقال یافته و به صورت خطی کشت داده شد تا با رسیدن به کلنی تک از خلوص آن اطمینان حاصل شود. سویه‌های مشکوک چندین مرتبه پاساژ داده شدند.

جداسازی سویه های باکتری با قابلیت تبدیل زیستی کافئین به تئوبرومین و پارازانتین

در این قسمت از پژوهش، از سویه‌های باکتری بومی جدا شده در طی مراحل غنی‌سازی استفاده شد. غربالگری اولیه با استفاده از تکنیک TLC، بوسیله یک روش دو مرحله‌ای غربالگری، انجام شد (۱۳). در روش مذکور ابتدا سویه‌های باکتری جدا شده در محیط نوترینت براث (3g/l beef extract, 5g/l peptone, 5g/l NaCl, pH 7) به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سوبسترای کافئین در غلظت نهایی ۲/۵ گرم در لیتر، پس از فیلتراسیون از طریق پالایه‌های غشایی میلی پور ۰/۲۲ میکرونی، به محیط افزوده شد. مطالعات بیوترانسفورماسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm بررسی شد. پس از طی ۷۲ ساعت انکوباسیون اضافی نمونه‌ها مورد آنالیز کیفی TLC قرار گرفتند. در روش TLC، برای تعیین فاز متحرک (mobile phase) حلال‌های متعددی مانند (بوتانول، اتانول، متانول، آب، فرمیک اسید، هگزان،استیک اسید و اتیل استات) با نسبت‌های مختلف و به صورت‌های متفاوتی با یکدیگر ترکیب شدند که در نهایت ترکیب بوتانول، استیک اسید، آب با نسبت ۴: ۱: ۱ به عنوان مناسب‌ترین سیستم حلالی برای جداسازی متیل زانتین های استاندارد شناخته شد. براساس نتایج بدست آمده، مقادیر Rf (Retention factor) به دست آمده برای ۴ ترکیب کافئین، تئوفیلین، تئوبرومین و پارازانتین به ترتیب ۰/۵۳، ۰/۶۵، ۰/۴۶ و ۰/۵۳ بودند.

شناسایی فنوتیپی و فیلوژنیکی سویه‌ی باکتری CTB04

سویه‌ی باکتریCTB04 که براساس آنالیز TLC قابلیت زیست تبدیلی کافئین به تئوبرومین و پارازانتین را در بین سویه‌های باکتری جداسازی شده داشت، انتخاب و مورد شناسایی فنوتیپی و مولکولی قرار گرفت. شناسایی اولیه سویه‌ی CTB04 با آزمایش های فنوتیپی نظیر بررسی شکل کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، بررسی شکل میکروسکوپی باکتری، حرکت باکتری، توانایی تولید اسپور، تولید کاتالاز و اکسیداز، هیدرولیز ژلاتین، احیای نیترات، مصرف سیترات و هیدرولیز اوره طبق دستورالعمل Simbert and Krieg (۱۴) سنجیده شد. استخراج DNA ی ژنومی سویه‌ی CTB04 با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت متابیون (Mi-bacterial Genomic DNA Isolation Kit mi-BD 100) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تکثیر قطعه ژنومی 16S rDNA سویه‌ی CTB04 با استفاده از پرایمرهای همه‌گانی 8F (-5´ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) و 1541R (-5´ AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3´) که مربوط به کل ترادف ژنی 16S rDNA باکتری E. coli است، انجام شد (۱۵). محصول تکثیری ژن 16S rRNA طبق روش Ashengroph و همکاران شناسایی شد (۱۶). محصول خالص PCR برای تعیین توالی به کمپانی ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, Seoul, Korea) ارسال گردید. برای شناسایی توالی ها از برنامه‌های Finch TV و BioEdit (۱۷) و برای بررسی و آنالیز توالی‌ها از برنامه BLAST استفاده شد. در نهایت درخت فیلوژنیکی با استفاده از مدل Kimura-2 Parameters با الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه (Neighbor-Joining method) و به کمک نرم افزار MEGA 4 ترسیم و تفسیر گردید (۱۸).

تهیه سلول‌های در حال استراحت سویه‌ی باکتری CTB04

به منظور تهیه سلول‌های در حال استراحت سویه‌ی باکتری CTB04؛ سلول ها ابتدا در محیط نوترینت براث تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی رشد داده شدند. سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچالی (۳۰۰۰ دور، ۲۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) برداشت و پس از شستشو در بافر فسفات نمکی (4.2mM Na_2HPO_4, 2.2 mM KH_2PO_4 and 9 mM NaCl, pH 7)، مطالعات زیست تبدیلی با استفاده از سلول‌های برداشت شده و در حضور ۲/۵ گرم در لیتر در محیط بافری مذکور در دمای ۲۸ درجه

سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۵۰rpm انجام گرفت (۱۶). نمونه‌ها در فواصل زمانی مختلف مورد آنالیز کمی HPLC قرار گرفتند.

سنجش کافئین و دیگر متیل زانتین ها با استفاده از HPLC

سنجش کمی میزان کافئین، تئوفیلین، تئوبرومین و پارازانتین 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 میلی‌متر استفاده شد. نوع فاز متحرک به کار گرفته شده مخلوط ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) متانول در آب بود که به صورت ایزوکراتیک با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه روی ستون فرستاده شد. طول موج استفاده شده ۲۷۸ نانومتر و حجم تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود. همه مراحل آزمایش در دمای اتاق انجام گرفت. تحت شرایط کروماتوگرافی ذکر شده، زمان های بازداری برای استانداردهای تئوبرومین، پارازانتین، تئوفیلین و کافئین به ترتیب در زمان های ۵/۹، ۸/۴، ۹/۵ و ۱۲/۱ دقیقه بدست آمد.

یافته ها

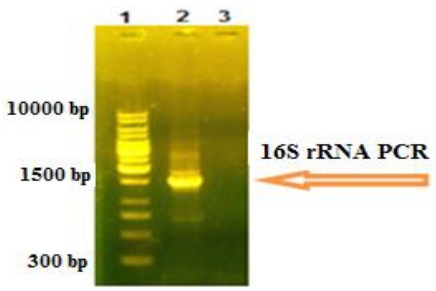
غنی سازی و جداسازی سویه های باکتری با توان بالقوه‌ی تبدیل زیستی کافئین به متیل زانتین‌های باارزش

جداسازی سویه‌های باکتری بومی با قابلیت تجزیه کنندگی کافئین (استفاده از کافئین به عنوان تنها منبع کربن و ازت)

گام نخست در انتخاب سویه‌های برتر برای تولید زیستی متیل زانتین‌های باارزش مانند تئوبرومین و پارازانتین از سوبسترای ارزان قیمت کافئین است. در این راستا در یکسری آزمایشات غربالگری ۲۱ سویه باکتری با توان بالقوه‌ی تجزیه کنندگی کافئین براساس تکنیک غنی‌سازی جدا سازی شدند. قابلیت زیست تبدیلی کافئین به تئوبرومین در تمام این سویه‌ها با استفاده از آنالیز کیفی TLC مورد بررسی قرار گرفت. در بین سویه‌های جداسازی شده، سویه‌ی CTB04 بالاترین میزان تولید تئوبرومین را نشان داد. سویه‌ی مذکور به عنوان سویه‌ی برتر جهت انجام مطالعات فنوتیپی و مولکولی برگزیده شد.

شناسایی سویه‌ی باکتری CTB04

سویه‌ی باکتری CTB04 که براساس آنالیزهای TLC و HPLC قابلیت زیست تبدیلی کافئین به تئوبرومین و پارازانتین را دارا بود، انتخاب و براساس ویژگی‌های مورفولوژیک و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت. سویه‌ی مذکور گرم مثبت، اکسیداز و کاتالاز مثبت، از نظر متابولیسمی هوازی و دارای قابلیت تشکیل اندوسپور بود. این سویه از آب‌های طبیعی با خاصیت درمانی جداسازی شده بود. جهت شناسایی دقیق سویه‌ی CTB04، ابتدا DNA ی ژنومی استخراج و سپس ژن کد کننده 16S rDNA طریق پرایمرهای یونیورسال 8F و 1541R مورد واکنش PCR قرار گرفت (شکل ۱). همانگونه که در شکل قابل مشاهده می باشد محصول PCR مناسب در ناحیه 1500 pb نمایان شده که بیانگر خلوص DNA ی مورد استفاده جهت تعیین توالی می‌باشد.

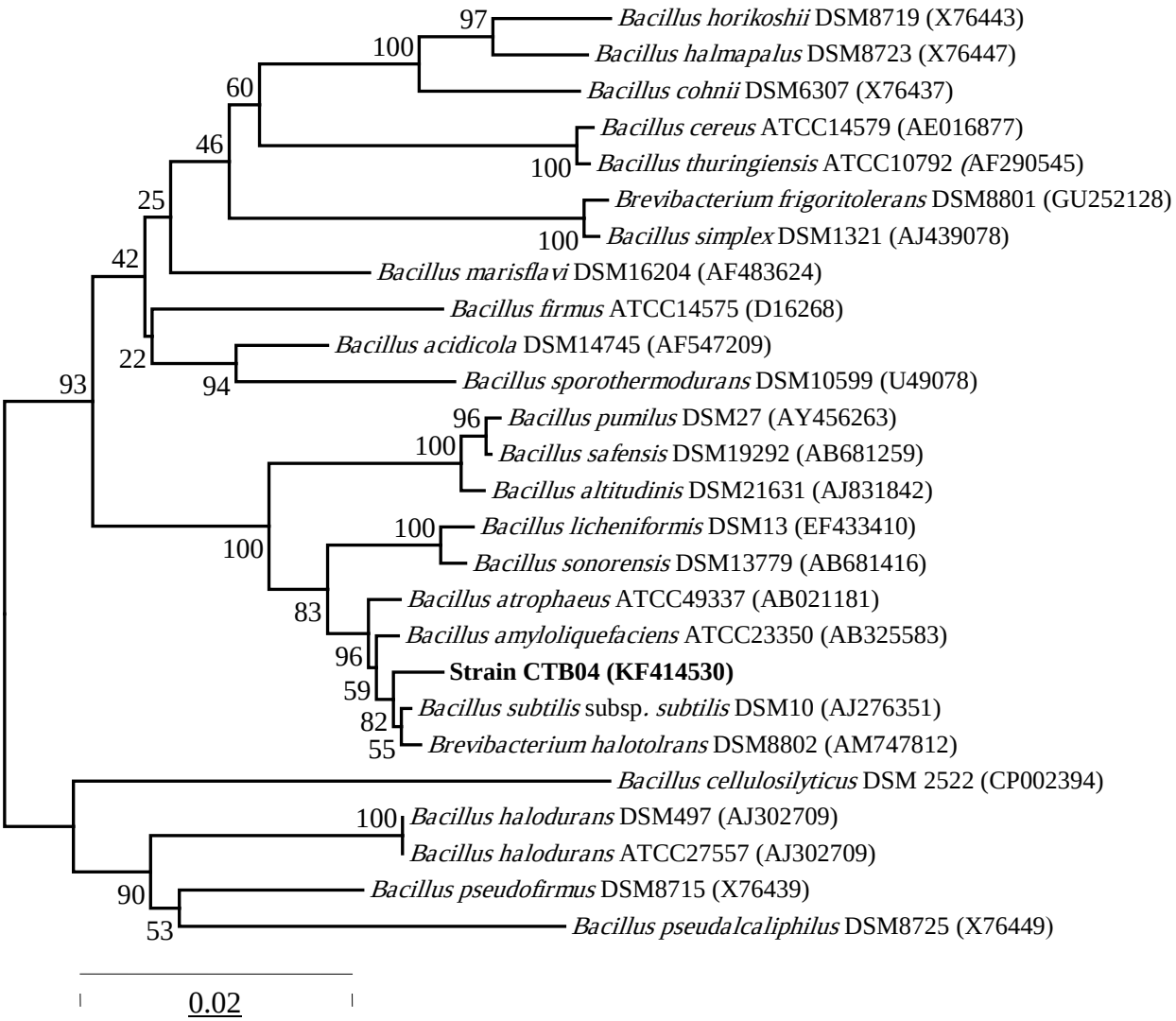


شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR سویه CTB04. ۱: مارکر مولکولی، ۲: سویه باکتری و ۳: کنترل منفی

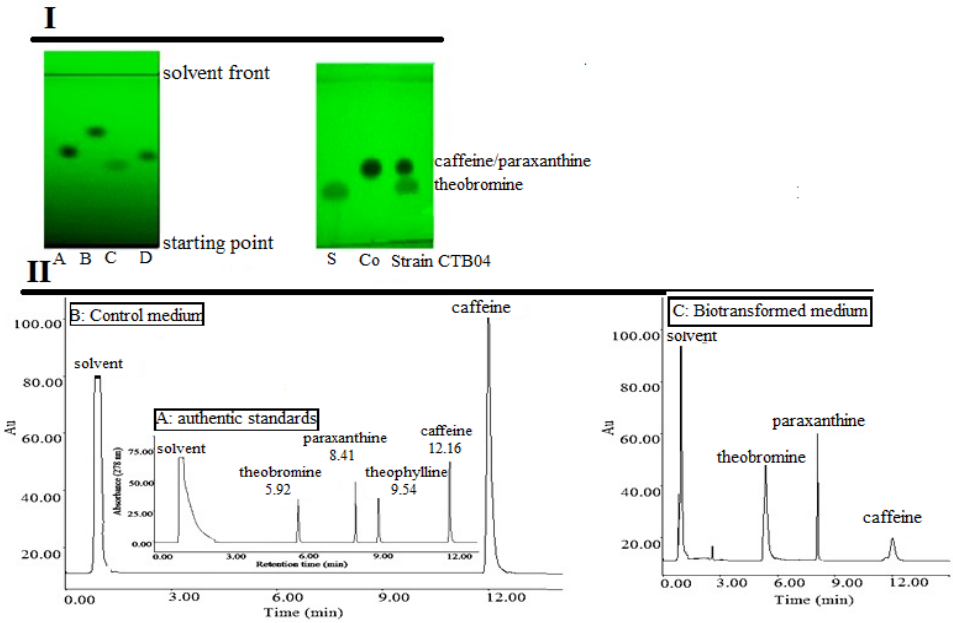
پس از مشخص شدن توالی ژن 16S rRNA سویه‌ی CTB04، آنرا در برنامه کامپیوتری BLAST قرار دادیم و سپس با استفاده از سایت NCBI باکتری مورد نظر شناسایی شد. براساس نتایج حاصل از بلاست این سویه دارای مشابهت ۹۹ درصدی با سویه-های Bacillus subtiliS شناخته شده می‌باشد. بعد از تعیین توالی ژن 16S rRNA سویه‌ی باکتری CTB04، این ژن در GenBank با شماره دسترسی (Accession number) KF414530 ثبت شد. در ادامه با ترسیم درختچه فیلوژنی که بر اساس آنالیزهای توالی ژن 16S rRNA به روش neighbor-joining بدست آمده است، موقعیت سویه‌ی CTB04 در بین گونه های جنس Bacillus نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده از درخت فیلوژنی، سویه‌ی جدا شده تحت عنوان B. subtilis strain CTB04 تشخیص داده شد (شکل ۲).

استفاده از سلول های در حال استراحت سویه‌ی بومی *B. subtilis* strain CTB04 در تبدیل زیستی کافئین به پارازانتین و تئوبرومین

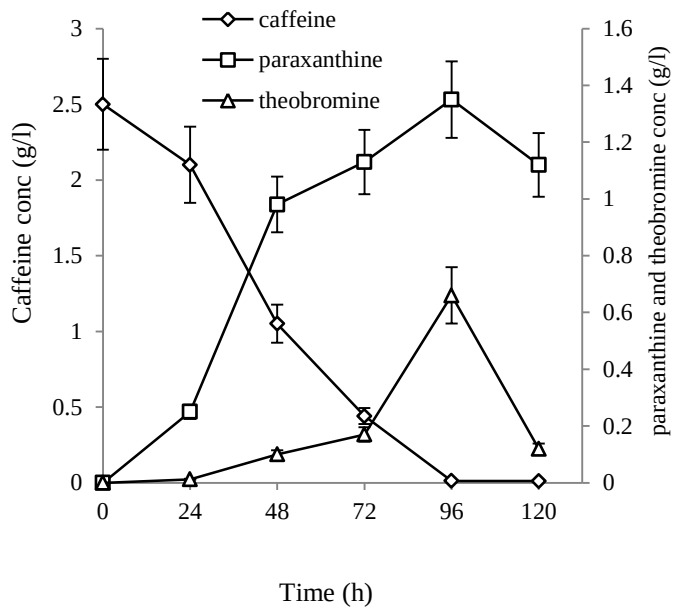
در این تحقیق بیوترانسفورماسیون کافئین با استفاده از سلول-های در حال استراحت *B. subtilis* CTB04 مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا سلول‌های باکتری در محیط نوترینت براث تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی رشد داده شدند (ساعت ۲۴ ام). پس از برداشت سلولها و شستشوی آنها در محیط بافری، از این سلول‌های در حال استراحت برداشت شده در انتهای فاز رشد لگاریتمی در محیط بافری حاوی ۲/۵ گرم در لیتر سوبسترای کافئین، به عنوان بیوکاتالیزور برای مطالعات بیوترانسفورماسیون کافئین استفاده شد. با هدف شناسایی متابولیت-های اصلی حاصل از بیوترانسفورماسیون کافئین، آنالیزهای TLC وHPLC انجام شد. همانگونه که در شکل (۳ قسمت‌های I و II) مشاهده می‌شود در طی بیوترانسفورماسیون کافئین بوسیله سویه مذکور، دو متابولیت اصلی شامل پارازانتین و تئوبرومین تشخیص داده شد. در کشت‌های کنترل (حاوی ۲/۵ گرم در لیتر سوبسترای کافئین بدون تلقیح باکتری) این متابولیت‌ها ظاهر نشده است که نشان می‌دهد کافئین قابلیت تبدیل شدن در شرایط غیرزیستی را ندارد (شکل ۳).



شکل ۲: درختچه فیلوژنی سویه باکتری CTB04 با استفاده از روش neighbor-joing.



شکل ۳: کروماتوگرام‌های حاصل از TLC (I) وHPLC (I I) پس از ۷۲ ساعت واکنش بیوترانسفورماسیون سوبسترای کافئین بوسیله سلول‌های در حال استراحت B. subtilis CTB04. A: کافئین استاندارد، B: تئوفیلین استاندارد، C: تئوبرومین استاندارد، D: پارازانتین استاندارد، S: تئوبرومین استاندارد، Co: محیط کنترل (حاوی سوبسترای کافئین و بدون تلقیح سویه باکتری CTB04).



شکل ۴: بیوترانسفورماسیون سوبسترای کافئین بوسیله سلول های در حال استراحت B. subtilis strain CTB04. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش و بار۱± معرف انحراف معیار است.

همانگونه که در شکل (۴) مشاهده می‌شود پس از گذشت ۹۶ ساعت از شروع فرآیند بیوترانسفورماسیون سوبسترای کافئین به طور کامل از مخلوط واکنش بیوترانسفوورماسیون بوسیله سویه‌ی CTB04 حذف شده است. سلول‌های در حال استراحت این سویه پتانسیل تبدیل ۲/۵ گرم در لیتر از سوبسترای کافئین را به ۱/۳۵ گرم در لیتر پارازانتین (راندمان مولی ۵۸/۲ درصد) و ۰/۶۶ گرم در لیتر تئوبرومین (راندمان مولی ۲۸/۴ درصد) را پس از گذشت ۹۶ ساعت از شروع واکنش بیوترانسفورماسیون دارا می-باشند. راندمان‌های مولی حاصل از رابطه زیر تخمین زده شده است:

Molar yield (%) = g paraxanthine or theobromine produced × molecular weight of caffeine/ g caffeine added × molecular weight of paraxanthine or theobromine

افزایش زمان واکنش بیوترانسفورماسیون باعث کاهش در غلظت پارازانتین و تئوبرومین تولیدی شده که به سبب متابولیزه شدن ترکیبات اخیر (دی متیلاسیون) به ترکیبات متیل زانتینی دیگر از جمله ۷- متیل زانتین و زانتین می‌باشد.

بحث

بشر امروزی از گذشته‌های دور تمام امکانات فکری و عملی خود را به کارگرفته است تا با بهره‌گیری از امکانات بالقوه‌ی جهان هستی بتواند به سوی زندگی راحت‌تر قدم برداشته و سطح مشکلاتی را که با آن‌ها روبروست به حداقل برساند. امروزه فرآورده‌های زیستی زیادی توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود، ترکیبات کم ارزش توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها به ترکیباتی با ارزش افزوده‌ی بالا تبدیل شده و ترکیبات ناخواسته‌ای که وجود آن‌ها در زندگی انسان مفید نیست توسط میکروارگانیسم‌ها حذف می‌شوند. یکی از این ترکیبات سمی کافئین است که در تعدادی از محصولات غذایی و همچنین پسماندهای صنعتی کارخانه های سازنده چای و قهوه وجود دارد. این ترکیب در کنار خواص مفید، دارای مضراتی برای سلامتی و محیط‌زیست می‌باشد که ضرورت حذف آن را به خوبی آشکار ساخته است. از طرفی تفاله‌های قهوه حاصل از فرآیند ساخت قهوه در کارخانه های صنعتی سرشار از منابع غذایی مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها می‌باشند که پس از حذف کافئین، قابلیت استفاده به عنوان خوراک دام را کسب می‌نمایند (۱۰ و ۱۱). روش‌های مرسوم جهت حذف کافئین دارای معایبی می‌باشند که از جمله می‌توان به ناسازگاری حلال‌ها و ترکیبات به کار گرفته شده با محیط‌زیست، گران بودن مواد به کار رفته و همچنین غیراختصاصی بودن برای کافئین که منجر به حذف سایر ترکیبات معطر از محصولات غذایی می‌گردد، اشاره نمود (۱۹). بنابراین در سال‌های اخیر محققان به دنبال شناسایی سویه‌های میکروبی با قابلیت حذف کافئین از محصولات غذایی، پسماند کارخانه‌جات سازنده چای و قهوه می‌باشند. از طرف دیگر در مسیر تجزیه کافئین توسط میکروارگانیسم‌ها از ضایعات کشاورزی و صنعتی مانند تفاله‌های چای و قهوه محصولات باارزشی مانند پارازانتین و تئوبرومین نیز تولید می‌گردد که در صنایع پزشکی و دارویی کاربرد فراوانی دارند. این ترکیبات نسبت به کافئین گران‌تر و پرکاربردتر می‌باشند و بنابراین استفاده از میکروارگانسیم‌های تجزیه کننده‌ی کافئین به عنوان کاتالیزورهای زیستی مبتنی بر شیمی سبز از منظر بیوترانسفورماسیون میکروبی

جهت تولید محصولات دارویی با ارزش افزوده‌ی بالا نیز حائز اهمیت می‌باشد. از آنجایی که کافئین اساساً برای میکروارگانیسم‌ها سمی است. لذا این موجودات باید ویژگی‌های متابولیسمی و سیستم آنزیمی بسیار کارآمدی داشته باشند تا بتوانند کافئین را بشکنند و از آن به عنوان منبع انرژی استفاده کنند. کاتابولیسم کافئین (۱و۳و۷ – تری‌متیل‌گزانتین) در میکروارگانیسم‌ها با دو سازوکار دمتیلاسیون و اکسیداسیون امکان‌پذیر است. کافئین یک متیل‌گرانتین است و در موقعیت کربن ۱ و ۳ و۷ دارای سه گروه متیل است. گروه‌های متیل همواره به عنوان هدفی برای آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی کافئین مطرح بوده‌اند. حذف هر کدام از گروه‌های متیل می‌تواند منجر به تولید سایر متیل‌زانتین‌های باارزش شود که این امر از لحاظ بیوتکنولوژی و اقتصادی بسیار مفید است. طی دمتیلاسیون کافئین در باکتری‌ها بیشترین ترکیب تولید شده تئوبرومین (۳و۷– دی‌متیل‌گزانتین) و پارازانتین خواهد بود در حالی که در قارچ‌ها، عمده متابولیت تولید شده تئوفیلین (۱و۳– دی‌متیل‌گزانتین) است (۲۰). اولین گزارش‌ها از تجزیه‌ی کافئین توسط میکروارگانیسم‌ها در اوایل دهه‌ی ۷۰ میلادی منتشر شد (۲۱). در ادامه سویه‌های مختلفی از باکتری‌ها، قارچ‌ها ی رشته‌ای و مخمرها گزارش شدند که توانایی تجزیه‌ی کافئین را داشتند. در بین باکتری‌ها سویه‌های متعلق به جنس Pseudomonas و در قارچ‌ها سویه های متعلق به جنس Aspergillus و Penicillium با کارایی زیادی می‌توانند کافئین را حذف کنند. تا کنون گزارش-های زیادی از میکروارگانیسم‌هایی که قابلیت تجزیه کافئین را دارند منتشر شده است. در اولین گزارش که مربوط به قارچ‌های *P*enicillium roquefort*i* و *Stemphylium sp.* بود بیان شد این قارچ‌ها قادرند ۰/۱۹ گرم در لیتر کافئین را طی ۲۹ ساعت تجزیه کنند (۲۲). همچنین فرآیندی برای حذف کافئین پیشنهاد شده است که در آن از باکتری *S*erratia marcescens که می‌تواند طی ۷۲ ساعت کافئین با غلظت ۰/۶ گرم در لیتر را به صورت ۱۰۰٪ تجزیه کند، استفاده شده است (۲۳). *Sarath* و همکارانش سویه ای از Pseudomonas alcaligenes CFR1708 را غربالگری و شناسایی نمودند که قادر بود در طی ۶ ساعت انکوباسیون به طور کامل محلول‌های حاوی یک گرم در لیتر کافئین را تجزیه کنند (۲۴). یک سویه از Pseudomonas stutzeri جداسازی شده است که طی ۲۴ ساعت قابلیت تجزیه ۵۹٪ از کافئین با غلظت اولیه ۱/۲ گرم در لیتر را دارد (۱۹). در مطالعه دیگری مشخص شد قارچ Aspergillus tamari طی ۹۶ ساعت تخمیر می‌تواند ۴۱ تا ۵۱ درصد از کافئین با غلظت اولیه ۲ تا ۴ گرم در لیتر را تجزیه کند (۲۵). با وجود اینکه تجزیه‌ی زیستی کافئین تحت سلول های رویشی در انواع مختلفی از اورگانیسم ها شامل باکتریها، مخمرها و کپک های رشته ای گزارش شده است اما با این وجود در مورد بیوترانسفورماسیون کافئین بوسیله میکروارگانیسم هامطالعات نادری صورت گرفته است. Asano و همکاران (۲۶) با استفاده از تکنیک غنی سازی سویه‌ای از Pseudomonas putida جداسازی نمودند که در طی تجزیه کافئین قادر به بیوترانسفورماسیون کافئین به تئوبرومین و پارازانتین بود. Sarath و همکاران (۲۴) سویه‌ای از P. alcaligenes MTCC 5264 را غربالگری نمودند که در طی تجزیه کافئین قادر به بیوترانسفورماسیون کافئین به تئوبرومین و پارازانتین بود. در این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتری بومی با پتانسیل بیوترانسفورماسیون کافئین به تئوبرومین و دیگر متیل گزانتین های باارزش به ویژه پارازانتین مورد مطالعه قرار گرفت و برای نخستین بار کاربرد سلول‌های در حال استراحت سویه‌ی بومی Bacillus subtilis CTB04 به عنوان کاتالیست زیستی در تولید تئوبرومین و پارازانتین گزارش شد. لازم به ذکر است که راندمان‌های بدست آمده برای بیوترانسفورماسیون کافئین (۵۸/۲ درصد برای پارازانتین و ۲۸/۴ درصد برای تئوبرومین) در این پژوهش تحت شرایط غیربهینه شده بوده و بنابراین پس از استفاده از فرآیندهای بهینه سازی می توان امیدوار بود که سویه‌ی بومی مذکور را بتوان به عنوان یک بیوکاتالیزور مناسب برای مطالعات بیوترانسفورماسیون کافئین به متابولیت های باارزش به ویژه تئوبرومین استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه که برای اولین بار در ایران انجام شده است، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده‌ی کافئین را به عنوان بیوکاتالیزورهای ایمن و ارزان قیمت در تولید دی متیل گزانتین های طبیعی با ارزش از سوبسترای ارزان قیمت کافئین پیشنهاد می‌نماید. به عنوان یک نتیجه گیری نهایی آنچه که از تحقیق اخیر حاصل شد این است که برخلاف بسیاری از تحقیقات صورت پذیرفته که در آنها از سلول‌های رویشی میکروارگانیسم ها با هدف حذف زیستی کافئین سمی از محیط‌های آلوده استفاده شده است، این پژوهش پیشنهاد راهکاری دومنظوره هم جهت پاک‌سازی کافئین از محیط‌های آلوده و همچنین راهکاری برای تولید دی‌متیل زانتین‌های‌های با ارزش دارویی به ویژه تئوبرومین را تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت عرضه می‌کند. بنابراین می توان همچنان کشف و شناسایی سویه‌های جدید تجزیه کننده‌ی کافئین را به عنوان افقی نو در تولید متیل زانتین‌های با ارزش افزوده بالا از سوبسترای ارزان قیمت کافئین پیشنهاد نمود.

References

1. Essayan DM. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Allergy Clin Immunol* 2001; **108**(5): 671-680.
2. Gressner OA, Lahme B, Siluschek M, Gressner AM. Identification of paraxanthine as the most potent caffeine-derived inhibitor of connective tissue growth factor expression in liver parenchymal cells. *Liver Int* 2009; **29**(6): 886-897.
3. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 2005; **174**(2): 589-594.
4. Hawke1 TJ, Allen DG, Lindinger MI. Paraxanthine, a caffeine metabolite, dose dependently increases [Ca^{2+}] ion in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2000; **89**(6): 2312-2317.
5. Slattery M, West D. Smoking, alcohol, coffee, tea, caffeine, and theobromine: risk of prostate cancer in Utah (United States). *Cancer Causes Control* 1993; **4**(6): 559-563.
6. Kakuyama A, Sadzuka Y. Effect of methylxanthine derivatives on doxorubicin transport and antitumor activity. *Curr Drug Metab* 2001; **2**(4): 379-395.
7. Usmani O, Belvisi M, Patel H, Crispino N, Birrell M, Korbonits M, et.al. Theobromine inhibits sensory nerve activation and cough. *Faseb J* 2005; **19(**2): 231-233.
8. Ashihara H, Monteiro AM, Moritz T, Gillies FM, Crozier A. Catabolism of caffeine and related purine alkaloids in leafs of *Coffeea Arabica* L. *Planta* 1996; **198**(3): 334-339.
9. Glassmeyer ST, Furlong ET, Kolpin DW, Cahill JD, Zaugg SD, Werner SL, et.al. Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environ Sci Technol* 2005; **39**(14): 5157-5169.
10. Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Brand D, Mohan R, Roussos S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochem Eng J* 2000; **6**(2): 153-162.
11. Rojas JBU, Verreth JAJ, Amato S, Huisman ES. Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. *Bioresour Technol* 2003; **89**(3): 267-274.
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Springs Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y; 1989.
13. Shimoni E, Ravid U, Shoham Y. Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *J Biotechnol* 2000; **78**(1): 1-9.
14. Simbert RM, Krieg NR. *Phenotypic Characterization. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (Eds) Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, DC, 1994; PP: 607-654.
15. Löffler FE, Sun Q, Li J, Tiedje JM. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**(4): 1369-1374.
16. Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F. Novel strain of *Bacillus licheniformis* SHL1 with potential converting ferulic acid into vanillic acid. *Ann Microbiol* 2012; **62**(2): 553-558.
17. Hall T. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium *Series* 1999; **15**(6): 89-95.
18. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; **24**(8): 1596-1599.
19. 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**(2): 17-27.
20. Gokulakrishnan S, Chandraraj K, Gummadi SN. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme Microb Technol* 2005; **37**(2): 225-232.
21. Kurtzman RH, Schwimmer S. Caffeine removal from growth media by microorganism. *Experientia* 1971; **27**(4): 481-482.
22. Schwimmer S, Kurtzman RH. Caffeine metabolism by Penicillium roqueforti. *Arch Biochem Biophys* 1971; **147**(1): 109-113.
23. Mazzafera P, Olsson O, Sandberg G. Degradation of caffeine and related methylxanthines by *Serratia marcescens* isolated from soil under coffee cultivation. *Microb Ecol* 1996; **31**(2): 199-207.
24. Sarath Babu VR, Patra S, Thakur MS, Karanth NG, Varadaraj MC. Degradation of caffeine by

Pseudomonas alcaligenes CFR 1708. *Enzyme Microb Technol* 2005; **37**(6): 617-624.

25. Gutiérrez-Sánchez G, Roussos S, Augur C. Effect of caffeine concentration on biomass production, caffeine degradation, and morphology of *Aspergillus tamarii*. *Folia Microbiol* 2013; **58**(3): 195-200.

26. Asano Y, Toshihiro K, Yamada H. Microbial production of theobromine from caffeine. *Bio Sci Biotechnol Biochem* 1993; **57**(8): 1286-1289.