اثر عصاره فلفل بر تولید کوآنزیم Q_{10} توسط *Gluconobacter japonicus* FM10

فوزیه مقدمی*

استادیار، گروه زیست شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1399/1/26 تاریخ پذیرش: 1399/7/13

صندوق پستی: 19395-4697 **fouziehm@yahoo.com**

چکیده:

کوآنزیم Q_{10} جزیی از زنجیره تنفسی است که با انتقال الکترون، سبب تولید انرژی می‌شود. امروزه به دلیل تقاضای روزافزون کوآنزیم Q_{10}، تولید آن رو به افزایش است. در این پژوهش، اثر عصاره حاوی کارتنوئید استخراج‌شده از فلفل دولمه‌ای به‌عنوان یک پیش‌ساز جهت افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} با *Gluconobacter japonicus* FM10 بررسی شد. بدین‌منظور، ابتدا کارتنوئید کل موجود در چهار رنگ فلفل دولمه‌ای استخراج و سپس حداقل غلظت بازدارنده رشد این عصاره‌ها اندازه گیری شد. در مرحله بعد، اثر عصاره‌ها بر تولید کوآنزیم Q_{10} در دو فاز رشد سکون و لگاریتمی به صورت مجزا بررسی شد. نتایج نشان داد که تولید کوآنزیم Q_{10} در حضور عصاره فلفل دولمه‌ای افزایش پیدا کرد (4/1 میلی‌گرم در لیتر در حضور عصاره فلفل دولمه‌ای قرمز). درواقع 1/5برابر بیش از زمانی که هیچ عصاره‌ای افزوده نشد. افزودن عصاره فلفل قرمز در فاز لگاریتمی نیز سبب افزایش کوآنزیم Q_{10} تا 4/9 میلی‌گرم بر لیتر شد، درحالی‌که افزودن آن در فاز سکون بر تولید کوآنزیم Q_{10} اثری نداشت. ازاین‌رو می‌توان نتیجه گرفت که کارتنوئیدهای موجود در عصاره فلفل با تأثیر بر رشد سلولی و افزایش آن سبب افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} می‌شود. بنابراین، می‌توان عصاره کارتنوئیدی فلفل دولمه‌ای را به‌عنوان پیش‌ساز مناسبی جهت افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} معرفی کرد.

کلید واژگان: کوآنزیم Q_{10}، *Gluconobacter japonicus*، کارتنوئید، فلفل دولمه‌ای

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]

مقدمه

کوآنزیم Q، یک ترکیب لیپوفیلیک شبه‌ویتامین است که جزیی از سیستم زنجیره تنفسی پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها محسوب می‌شود. کوآنزیم Q از دو جزء اصلی ساخته شده است. یک بخش آروماتیک که حلقه کوئینونی نام دارد و بخش عملکردی این ملکول است و بخش دیگر یک زنجیره ایزوپرونوئیدی است که از چندین ایزوپرن ساخته شده و وظیفه آن نگهداری ملکول کوآنزیم Q در غشا است [1]. تعداد واحدهای ایزوپرن می‌تواند 6 تا 10 عدد باشد. کوآنزیم Q که حاوی 10 ایزوپرن باشد کوآنزیم Q_{10} یا Ubiquinone نامیده می‌شود. به دلیل تمایل بالای این ملکول در جذب الکترون، کوآنزیم Q_{10} نقش‌های فراوانی در سلول دارد. ازجمله می‌توان به نقش آن به‌عنوان واسطه در زنجیره تنفسی اشاره کرد که سبب انتقال الکترون و تولید انرژی می‌شود [2]. کوآنزیم Q_{10} می‌تواند الکترون‌ها و بارهای اضافی موجود بر ملکول‌های اکسیژن فعال را جذب و اثر آنتی‌اکسیدانی خود را بر رادیکال‌های آزاد اکسیژن اعمال کند. ازاین‌رو کاربردهای فراوانی یافته است. امروزه به‌عنوان یک مکمل جهت افزایش انرژی و ایمنی بدن و همین‌طور مکمل ضد التهاب و ضد پیری استفاده‌های بسیاری دارد. از طرفی، در درمان بیماری‌های پارکینسون، هانتینگتون، سرطان، ایدز و دیستروفی ماهیچه‌ای استفاده می‌شود. در ضمن در سلامت دندان و لثه، کاهش قند خون و حفاظت از چربی‌ها در لوازم آرایش، داروها و غذاها نیز مؤثر است [3].

مسیر بیوسنتز این ملکول بسیار پیچیده بوده و در موجودات مختلف متفاوت است، ولی به‌طورکلی دو مرحله جداگانه دارد: مرحله بیوسنتز حلقه کوئینونی و مرحله بیوسنتز زنجیره ایزوپرونوئیدی. پس از سنتز، هر دو جزء با هم پیوند می‌خورد و ملکول اصلی حاصل می‌شود [4]. تولید کوآنزیم Q_{10} اکنون عمدتاً به سه روش سنتز شیمیایی، سنتز نیمه‌شیمیایی (استخراج از گیاهان و اصلاح ساختار) و فرایند تخمیر میکروبی انجام می‌گیرد، ولی چون این ملکول پیچیدگی ساختاری خاصی دارد و مسیر بیوسنتز آن نیز پیچیده است، هزینه سنتز شیمیایی و نیمه-شیمیایی آن بالا است. بنابراین، فرایند تخمیر میکروبی به دلیل ارزان‌تربودن و نداشتن تولید ایزومر نوری بیشتر مورد توجه است [5]. در روش فرایند تخمیر میکروبی، علاوه بر جستجو برای یافتن سویه‌های مناسب که بتوانند مقادیر بالایی از کوآنزیم Q_{10} را تولید کنند، راهکارهایی نیز برای افزایش تولید وجود دارد [6]. ازجمله می‌توان به افزایش تولید از طریق بهبود شرایط تولید [2]، مهندسی متابولیک [7,8]، ایجاد جهش [9] و استفاده از پیش-سازهای تولید [10,11] اشاره کرد. موادی که به‌عنوان پیش‌ساز به محیط کشت میکروارگانیزم‌های تولیدکننده کوآنزیم Q_{10} افزوده می‌شود یا پیش‌ساز تولید حلقه کوئینونی هستند [12,13] یا زنجیره ایزوپرنوئیدی [11].

فلفل دولمه‌ای با نام علمی *Capsicum annuum* ترکیبات شیمیایی مختلفی را شامل می شود که عمدتاً از سه گروه اسانس‌های روغنی، موم‌ها و رنگدانه‌ها تشکیل شده‌اند. در میان آنها برخی از ترکیبات ساختار ایزوپرنوئیدی دارند و برای تشکیل آنها به واحدهای ایزوپرنی نیاز هست. این ترکیبات عبارت‌اند از: سولانسل، ویتامین‌های A و E و کارتنوئیدها [14,15]. کارتنوئیدها ترکیبات ترپنوئیدی هستند که از واحدهای ایزوپرنی ساخته شده‌اند و انواع مختلفی دارند که هرکدام علت ایجاد یکی از رنگ‌های زرد، نارنجی و قرمز در میوه‌ها و سبزیجات هستند [16]. همه کارتنوئیدهای موجود در یک میوه با اصطلاح کارتنوئید کل یا total carotenoid خوانده می‌شود. میزان کارتنوئید کل در رنگ‌های مختلف فلفل دولمه‌ای متفاوت است [17]. از کارتنوئیدهای

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]

موجود در فلفل دولمه‌ای می‌توان لوتئین، کپسانتین، بتاکاروتن، زئازانتین، ویالوزانتین و غیره را نام برد [18].

در این پژوهش فلفل دولمه‌ای به این دلیل به‌عنوان پیش‌ساز کوآنزیم Q_{10} انتخاب شد که یکی از سبزیجاتی است که مقادیر زیادی از انواع کارتنوئید دارد. ازاین‌رو اثر عصاره حاوی کارتنوئید استخراج‌شده از چهار رنگ فلفل دولمه‌ای به‌عنوان یک پیش‌ساز بر تولید کوآنزیم Q_{10} توسط *Gluconobacter japonicus* FM10 بررسی شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم و محیط‌های کشت: باکتری استفاده‌شده در این پژوهش سویه‌ای است با نام *Gluconobacter japonicus* FM10 که در پژوهش‌های قبلی جدا و شناسایی شده بود. این سویه روی محیط‌های GYC (گلوکز 50 گرم بر لیتر، عصاره مخمر 10 گرم بر لیتر، کربنات کلسیم 30 گرم بر لیتر و آگار 25 گرم بر لیتر) به مدت 2-3 ماه در دمای یخچال نگهداری و در 70- درجه سانتیگراد ذخیره شد [19]. محیط پیش کشت حاوی 20 گرم بر لیتر سوربیتول، 3 گرم بر لیتر عصاره مخمر و 3 گرم بر لیتر پپتون بود و محیط کشت تولید حاوی 110 گرم بر لیتر سوربیتول، 25 گرم بر لیتر عصاره مخمر، 35 گرم بر لیتر پپتون، 0/5 گرم بر لیتر KH_2PO_4 و 0/55 گرم بر لیتر $MgSO_4$. همه آزمایش‌ها در فلاسک‌های 250 میلی‌لیتری حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت با pH 6/5 انجام شد. پس از تلقیح، فلاسک‌ها به مدت 40 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد با سرعت 180rpm در انکوباتور نگهداری شدند [20]. کوآنزیم Q_{10} بعد از 40 ساعت در ابتدای فاز سکون استخراج شد.

استخراج و سنجش کوآنزیم Q_{10}: برای استخراج کوآنزیم Q_{10} ابتدا 1 میلی‌لیتر از محیط کشت 40 ساعته production culture را با سرعت 12000 rpm به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شد تا سلول‌ها جدا شوند سپس با آب مقطر شستشو داده و 450 میکرولیتر از محلول cell lytic B افزوده و نیم ساعت در دمای اتاق نگهداری شد تا سلول‌ها شکسته شوند. عمل استخراج در دو مرحله انجام گرفت. بدین‌صورت که ابتدا 900 میکرولیتر از حلال هگزان- 2 پروپانول با نسبت 5-3 به پلت حاصل از سانتریفوژ افزوده و پس از 5 دقیقه با سرعت 12000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ، بخش بالایی حاوی کوآنزیم Q_{10} به تیوب‌های تمیز منتقل شد. سپس تیوب‌ها در معرض هوای آزاد و دمای آزمایشگاه قرار داده شدند تا حلال‌ها بخار شوند و پودر حاوی کوآنزیم Q_{10} باقی بماند. برای سنجش کوآنزیم Q_{10}، پودر حاصل در 500 میکرولیتر اتانول HPLC grade حل، و 20 میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC (Agilent 1120, USA) تزریق شد. ستون مورد استفاده Thermo scientist C18 (250 mm× 4.5 mm× 5 µm) به دتکتور UV متصل شده بود و فاز متحرک اتانول: متانول (70: 30) با سرعت جریان 1 میلی‌لیتر بر دقیقه بود. کوآنزیم Q_{10} در طول موج 275 نانومتر شناسایی شد [8]. برای ترسیم منحنی استاندارد، نمونه کوآنزیم Q_{10} استاندارد نیز با شماره CAS 0-98-303 و مخصوص HPLC با درجه خلوص بالای 98 درصد از شرکت سیگما- آلدریچ خریداری و استفاده شد.

تعیین وزن خشک سلولی: هم‌زمان با استخراج کوآنزیم Q_{10}، 1 میلی‌لیتر از محیط کشت را نیز جهت تعیین وزن خشک سلولی با سرعت 12000 rpm به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شد تا سلول‌ها جدا شوند. پس از شستشو، سلول‌ها درون آون با دمای 60 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت قرار گرفتند.

استخراج و سنجش کارتنوئید: برای استخراج و سنجش رنگدانه‌های کارتنوئیدی موجود در فلفل دولمه-

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]

ای، از روش استخراج متانولی و سنجش با دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. بدین‌منظور 0/5 گرم از هر رنگ از پودر فلفل وزن شده و 25 میلی‌لیتر متانول به آن افزوده شد و به مدت 10 دقیقه با استفاده از همزن به صورت مکانیکی به هم زده شد. محتوای فلاسک‌ها با سرعت 10000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد. جذب محلول‌های حاصل در سه طول موج 470، 653 و 666 نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و مقدار کارتنوئید کل با فرمول‌های زیر محاسبه شد [21].

$$\text{Chlorophyll a} = 15.65\ A_{666} - 7.34\ A_{653}$$
$$\text{Chlorophyll b} = 27.05\ A_{653} - 11.21\ A_{666}$$
$$\text{Total Cartenoid} = (1000\ A_{470} - 2.86\ \text{Chlorophyll a} - 12.92\ \text{Chlorophyll b})/\ 245$$

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) عصاره‌های فلفل: عصاره‌های حاصل بعد از حلال‌پراکنی با نسبت 1600 میکروگرم در 1 میلی‌لیتر اتانول حل و برای ایجاد غلظتهای مختلف استفاده شدند. برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. سوسپانسیون میکروبی در سالین نرمال با غلظت 10^8CFU/ml × 1/5 معادل 0/5 مک فارلند تهیه و استفاده شد. از عصاره‌های فلفل سبز، زرد، نارنجی و قرمز، جداگانه با غلظت‌های 1600، 800، 400، 200، 100، 50، 25، 12، 6، 3 میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. چون عصاره‌ها، در محیط کشت به تنهایی سبب ایجاد یک رنگ می‌شوند که در غلظت‌های بالاتر بیشتر مشهود است، چاهک‌های 1 تا 11 با همان مقدار عصاره از همان رنگ جداگانه بدون تلقیح باکتری تکرار شدند تا پس از خواندن عدد جذب هر چاهک اصلی، مقدار جذب عصاره مربوط از آن تفریق شود.

اثر عصاره‌های فلفل بر تولید کوآنزیم Q_{10}: به فلاسک‌های تلقیح‌شده، میزان 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر از هرکدام از عصاره‌های فلفل سبز، زرد، نارنجی و قرمز جداگانه افزوده شد. فلاسک‌ها در گرمخانه 30 درجه سانتیگراد با سرعت 180rpm به مدت 40 ساعت گرماگذاری شدند و سپس میزان وزن خشک سلولی و کوآنزیم Q_{10} تولیدی اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر عصاره فلفل بر تولید کوآنزیم Q_{10} در فازهای رشد لگاریتمی و سکون: برای انجام‌دادن این بررسی، فلاسک‌های کشت به سه سری تقسیم شدند: به سری اول از فلاسک‌ها از ابتدا 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر (غلظت Sub MIC) از عصاره فلفل قرمز افزوده شد و سپس تلقیح انجام گرفت. به سری دوم از فلاسک‌ها بعد از 40 ساعت رشد، وقتی باکتری به فاز سکون رسید، این مقدار عصاره افزوده شد و سری سوم هم به‌عنوان شاهد، بدون افزودن عصاره تلقیح شد. فلاسک‌ها در گرمخانه 30 درجه سانتی‌گراد با سرعت 180 rpm به مدت 48 ساعت گرماگذاری شدند و هر 4 ساعت یک‌بار وزن خشک سلولی و میزان کوآنزیمQ_{10} تولیدی اندازه‌گیری شد.

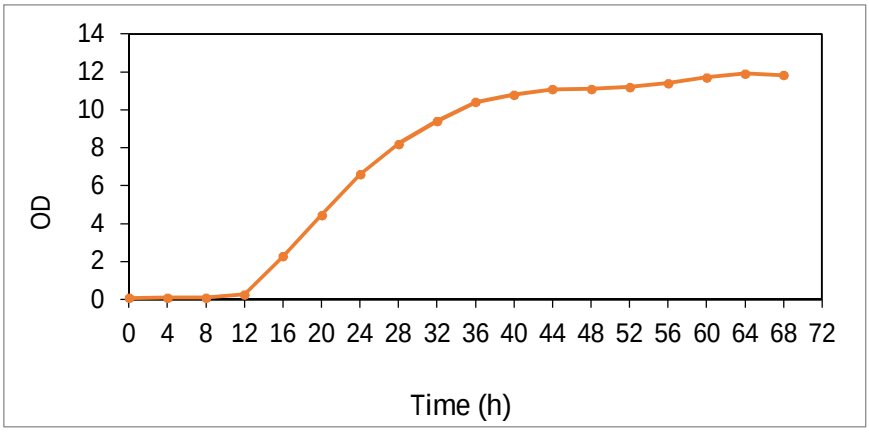
نتایج

سنجش کوآنزیم Q_{10}: تولید کوآنزیم Q_{10} در فلاسک‌های 250 میلی‌لیتری حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت با pH 6/5 و دمای 30 درجه سانتی‌گراد با سرعت 180rpm انجام شد. کوآنزیم Q_{10} بعد از 40 ساعت در ابتدای فاز سکون استخراج شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد کوآنزیم Q_{10}، میزان تولید کوآنزیم Q_{10} توسط سویه FM10 به دست آمد که برابر بود با 2/7 میلی‌گرم بر لیتر. وزن خشک سلولی آن 5/3 گرم بر لیتر و ظرفیت ویژه تولید نیز 0/5 میلی‌گرم بر گرم وزن خشک به دست آمد. ظرفیت ویژه تولید، مقدار کوآنزیم Q_{10} را در هر گرم از وزن خشک سلولی نشان می‌دهد. درواقع، ظرفیت ویژه کوآنزیم Q_{10} از تقسیم مقدار کوآنزیم Q_{10} بر وزن خشک سلولی به دست می‌آید [22]. تولید کوآنزیم Q_{10} توسط سویه FM10 قبل از افزودن عصاره‌های فلفل (2/7 میلی-

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

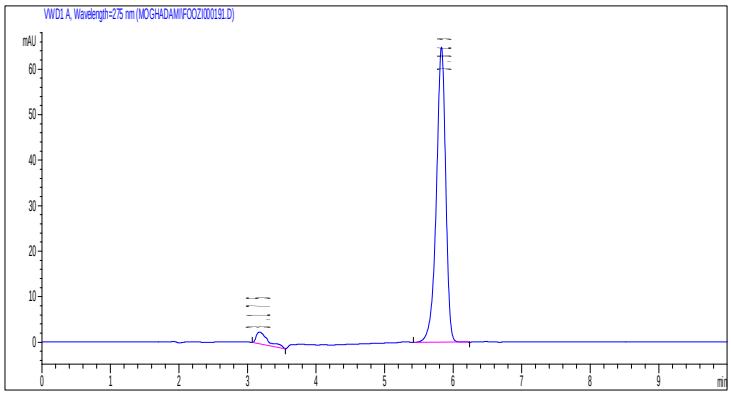
[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]

گرم بر لیتر) به‌عنوان مقدار شاهد در آزمایش‌های بعدی که عصاره فلفل افزوده شد، استفاده شد. سویه FM10 در محیط کشت تولید در مدت 40 ساعت به فاز رشد سکون رسید (شکل 1) ازاین‌رو در تمام آزمایش‌ها،40 ساعت پس از تلقیح، کوآنزیم Q_{10} استخراج شد.



شکل 1 منحنی رشد سویه FM10 در فلاسک 250 میلی‌لیتری حاوی سوربیتول به‌عنوان منبع کربن و عصاره مخمر و پپتون به عنوان منبع نیتروژن. pH اولیه محیط 6/5، دمای گرماگذاری 30 درجه سانتیگراد و طول مدت کشت 72 ساعت.

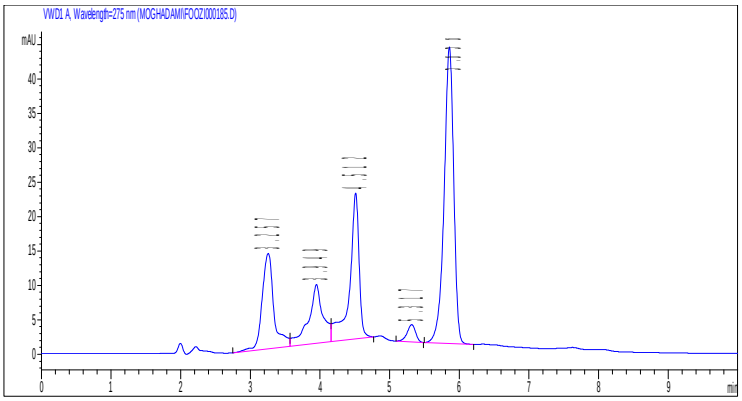
شناسایی کوآنزیم Q_{10} به‌وسیله دستگاه HPLC و در طول موج 275 نانومتر انجام گرفت. شکل 2 پیک کوآنزیم Q_{10} استاندارد را نشان می‌دهد که از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شده بود. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود پیک کوآنزیم Q_{10} استاندارد در زمان بازداری 5/8 دقیقه ترسیم شده است. شکل 3 نیز پیک کوآنزیم Q_{10} را نشان می‌دهد که به‌واسطه سویهٔ FM10 تولید شده که در زمان بازداری 5/8 دقیقه ترسیم شده است.



شکل 2 کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کوآنزیم Q_{10} استاندارد. پیک موجود در زمان بازداری 5/8 دقیقه نشان‌دهنده کوآنزیم Q_{10} است. کوآنزیم Q_{10} استاندارد از شرکت Sigma-Aldrich با CAS number: 303-98-0 (≥98%- HPLC)

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]



شکل 3 کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کوآنزیم Q_{10} تولیدشده توسط سویه FM10 که در دمای 30 درجه سانتیگراد و pH 6/5 تولید شده است. پیک موجود در زمان بازداری 5/8 دقیقه نشان‌دهنده کوآنزیم Q_{10} است.

سنجش کارتنوئیدهای موجود در فلفل دولمه ای:

برای استخراج و آنالیز رنگدانه‌های کارتنوئیدی موجود در فلفل دولمه‌ای، از روش استخراج متانولی و سنجش با دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. پس از به‌دست‌آوردن اعداد جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر، اعداد در فرمول-های ذکرشده جاگذاری شد و میزان کارتنوئید کل موجود در هر رنگ از فلفل دولمه‌ای به دست آمد. مقدار کارتنوئید موجود در فلفل دولمه ای mg/100g Dry Matter 129-417 بود. جدول 1 مقدار کارتنوئید کل در 100 گرم از پودر فلفل سبز، زرد، نارنجی و قرمز را نشان می‌دهد. طبق این جدول بیشترین مقدار کارتنوئید در فلفل دولمه‌ای قرمز وجود داشت (417 mg/100g DM)، پس از آن در فلفل نارنجی و کمترین مقدار کارتنوئید در فلفل دولمه‌ای زرد مشاهده شد.

جدول 1 مقدار کارتنوئید کل موجود در 100 گرم از پودر فلفل دولمه‌ای سبز، زرد، نارنجی و قرمز

فلفل دولمه ای	کارتنوئید کل (mg/100g dry matter)
سبز	129 ± 3
زرد	107 ± 12
نارنجی	390 ± 21
قرمز	417 ± 34

حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره‌های فلفل:

نتایج نشان داد که در غلظت‌های 400 میکروگرم بر میلی-لیتر و بالاتر از آن، برای هر 4 رنگ فلفل سبز، زرد، نارنجی و قرمز، هیچ رشدی در چاهک‌ها مشاهده نشد ازاین‌رو، غلظت 400 میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان MIC معرفی شد. سویه FM10 در حضور غلظت‌های 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمتر از عصاره فلفل‌های کدورت رشد داشت. بنابراین، غلظت 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره، به‌عنوان غلظت sub MIC انتخاب و برای بررسی‌های بعدی استفاده شد. جدول 2 مقادیر MIC عصاره‌های هر 4 رنگ فلفل دولمه‌ای را نشان می‌دهد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]

جدول 2 حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره‌های فلفل دولمه‌ای سبز، زرد، نارنجی و قرمز برای سویه FM10

غلظت عصاره فلفل (µg/ml)	3	6	12	25	50	100	200	400	800	1600
فلفل سبز	+	+	+	+	+	+	+	MIC	-	-
فلفل زرد	+	+	+	+	+	+	+	MIC	-	-
فلفل نارنجی	+	+	+	+	+	+	+	MIC	-	-
فلفل قرمز	+	+	+	+	+	+	+	MIC	-	-

تولید کوآنزیم Q_{10} در حضور عصاره فلفل: تولید کوآنزیم Q_{10} در حضور عصاره‌های فلفل انجام گرفت و نتایج نشان داد که بیشترین میزان تولید کوآنزیم Q_{10} در حضور عصاره فلفل قرمز تولید شد و مقدار آن برابر بود با **4/1** میلی‌گرم در لیتر. این عصاره بر افزایش وزن خشک سلولی نیز اثر داشت و آن را به **6/2** گرم بر لیتر افزایش داد. بعد از آن، عصاره فلفل نارنجی بیشترین افزایش را در تولید کوآنزیم Q_{10} سبب شد و عصاره فلفل سبز و زرد در مقام‌های سوم و چهارم قرار داشتند. میزان تولید کوآنزیم Q_{10} در صورتی که هیچ عصاره‌ای افزوده نشده بود (شاهد)، تقریباً برابر بود با زمانی که عصاره فلفل زرد افزوده شد. این نشان‌دهنده تأثیر ناچیز عصاره فلفل زرد بر افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} است. جدول **3** میزان کوآنزیم Q_{10} و وزن خشک سلولی را در حضور **200** میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره فلفل‌های سبز، زرد، نارنجی و قرمز را نشان می‌دهد. ضریب همبستگی بین میزان تولید کوآنزیم Q_{10} در حضور رنگ‌های مختلف عصاره‌های فلفل و میزان کارتنوئید در رنگ‌های مختلف عصاره‌های فلفل به دست آمد و برابر با **0/96** بود.

جدول 3 میزان کوآنزیم Q_{10} و وزن خشک سلولی را در حضور **200** میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره فلفل دولمه‌ای سبز، زرد، نارنجی و قرمز. نمونه شاهد میزان تولید کوآنزیم Q_{10} و وزن خشک سلولی در نبود حضور عصاره فلفل است.

فلفل دولمه ای	کوآنزیم Q_{10} (mg/l)	وزن خشک سلولی (g/l)	ظرفیت ویژه تولید کوآنزیمQ_{10} (mg/gDCW)
سبز	2/8 ± 0/09	5/5 ± 0/03	0/50
زرد	2/7 ± 0/1	5/4 ± 0/09	0/50
نارنجی	3/1 ± 0/07	5/9 ± 0/04	0/52
قرمز	4/1 ± 0/04	6/2 ± 0/03	0/66
شاهد	2/7 ± 0/03	5/3 ± 0/03	0/50

اثر عصاره فلفل قرمز در فاز لگاریتمی و سکون: عصاره فلفل قرمز چون بر تولید کوآنزیم Q_{10} بیشترین تأثیر را داشت، برای بررسی اثر عصاره بر تولید کوآنزیم Q_{10} در مراحل رشد فاز لگاریتمی و سکون از عصاره فلفل قرمز استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده درباره نمونه شاهد (هیچ عصاره‌ای افزوده نشد) و نمونه‌ای که **200** میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره فلفل در فاز سکون به آن افزوده شد یکسان است که این امر می‌تواند نشان‌دهنده بی‌تأثیربودن

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]

افزودن عصاره در فاز سکون باشد. این در حالی است که افزودن 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره فلفل قرمز در فاز لگاریتمی سبب شد مقدار کوآنزیم Q_{10} تا 4/9 میلی‌گرم بر لیتر افزایش یابد. جدول 4 میزان کوآنزیم Q_{10} و وزن خشک سلولی را در حضور 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره فلفل قرمز در دو فاز لگاریتمی و سکون را نشان می‌دهد.

جدول 4 میزان کوآنزیم Q_{10} و وزن خشک سلولی در حضور 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره فلفل قرمز در دو فاز لگاریتمی و سکون. نمونه بیانگر میزان تولید کوآنزیم Q_{10} و وزن خشک سلولی در نبود حضور عصاره فلفل است.

فاز رشد	کوآنزیم Q_{10} (mg/l)	وزن خشک سلولی (g/l)	ظرفیت ویژه تولید کوآنزیمQ_{10} (mg/gDCW)
لگاریتمی	4/1 ± 0/06	6/2 ± 0/04	0/66
سکون	2/7 ± 0/03	5/3 ± 0/03	0/50
شاهد	2/7 ± 0/03	5/3 ± 0/03	0/50

بحث

اثر ضد میکروبی فلفل عموماً به ماده‌ای به نام کپساسین و مشتقات آن و نیز فنل‌های موجود نسبت داده می‌شود که حین عمل اسانس‌گیری با سوکسله استخراج می‌شود [23]. مشخص شده است که میزان کارتنوئید در فلفل خشک ده برابر بیش از فلفل تازه و میزان فنل در فلفل خشک، نصف میزان فنل در فلفل تازه است [24]. ازاین‌رو، فلفل خشک می‌تواند کاندیدای مناسب‌تری برای استفاده به‌عنوان پیش‌ساز باشد. به همین دلیل، در این پژوهش از پودر فلفل (فلفل خشک) برای عصاره‌گیری استفاده شد. علاوه بر این، از عصاره یا اسانس که معمولاً در بررسی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی استفاده می‌شود استفاده نشد و به جای آن از روشی از عصاره‌گیری استفاده شد که سبب استخراج کارتنوئیدها می‌شود تا ه چه بیشتر از استخراج مواد ضد میکروبی نظیر فنل‌ها و کپسایسین و مشتقات آن پرهیز شود.

اثرات ضد میکروبی عصاره یا اسانس انواع فلفل بر رشد باکتری‌های مختلف تاکنون موضوع مطالعات مختلفی بوده است [23,25]. تحقیقات نشان داده که عصاره فلفل دولمه‌ای اثر ضد باکتری بر باکتری‌های Bacillus *subtilis, E.coli, Helicobacter pylori, Pseudomonas aeroginosa, Staphylococcus aureus, Vibrio cholera* داشته است [26-29]. ازاین‌رو لازم بود که قبل از بررسی اثر کارتنوئیدهای فلفل دولمه‌ای بر تولید کوآنزیم Q_{10}، حداقل غلظت بازدارنده رشد فلفل دولمه‌ای بر سویه FM10 به دست آید تا بتوان از غلظت‌های مناسبی از آن برای افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} استفاده کرد. نتایج نشان داد که عصاره حاوی کارتنوئید صرف‌نظر از رنگ فلفل، در غلظت‌های 400 میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشتر اثر ضد میکروبی بر رشد سویه FM10 داشت. این بدین معناست که میزان مواد ضد میکروبی که مانع رشد سویه FM10 شدند، در هر چهار رنگ عصاره به یک اندازه بود.

کارتنوئیدها ساختار ایزوپرنی دارند و از این جهت مشابه ساختار زنجیره ایزوپرنوئیدی در کوآنزیم Q_{10} هستند [18]. میزان کارتنوئید کل در انواع رنگی فلفل دولمه‌ای متفاوت است. گزارش شده است که فلفل دولمه‌ای زرد دارای بیشترین و فلفل دولمه‌ای سبز کمترین میزان کارتنوئید کل دارند. محتوای کارتنوئید کل در فلفل

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]

قرمز بین 100- 3200mg/100g DW گزارش شده است [14]. بیشترین مقدار کارتنوئید کل موجود در فلفل دولمه‌ای که تاکنون گزارش شده، برابر است با 7500 mg/100g DW که برای واریته‌ایی از مکزیک بوده است [16]. میزان کارتنوئید کل موجود در فلفل‌های دولمه‌ای رنگی که در این مطالعه بررسی شد، بین 112-417 mg/100g DW به دست آمد. بیشترین مقدارکارتنوئید در فلفل قرمز و کمترین آن در فلفل زرد مشاهده شد که با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعات دیگر مغایرت دارد [14]. این مغایرت می‌تواند به دلیل تفاوت در واریته فلفل‌های دولمه‌ای استفاده‌شده در پژوهش‌های مختلف باشد.

در پژوهشی که Bule و همکارش در سال 2009 انجام دادند، افزودن نکتار هویج و گوجه فرنگی به محیط کشت باکتری *Pseudomonas diminuta* به ترتیب سبب افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} از 6 به 29 و 24 میلی-گرم بر لیتر شد. در این پژوهش بیان شده است که دلیل افزایش تولید کوآنزیم Q_{10}، وجود کارتنوئیدها و پیش-سازهای کارتنوئیدی (واحدهای ایزوپرن) است که در هویج و گوجه فرنگی به میزان زیادی مشاهده می‌شود [11]. گزارش شده است که افزودن عصاره تنباکو به محیط کشت *Rhodosprillum rubrum* سبب افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} تا دو برابر شد [10]. در سویه *Sphingomonas sp.ZUTE03* هم که در شرایط معمولی 43 میلی‌گرم بر لیتر کوآنزیم Q_{10} تولید می‌کرد، افزودن سولانسل و 4- هیدروکسی بنزوئیک اسید تولید را به 442 میلی‌گرم بر لیتر رساند. سولانسل پیش‌ساز تولید زنجیره ایزوپرونوئیدی و 4- هیدروکسی بنزوئیک اسید، پیش‌ساز تولید حلقه کوئینونی است [12].

نتایج این پژوهش نشان داد تولید کوآنزیم Q_{10} در حضور عصاره کارتنوئیدی فلفل تا 1/5برابر افزایش یافت. بیشترین مقدار کوآنزیم Q_{10} در حضور عصاره فلفل قرمز (4/1 میلی‌گرم بر لیتر) تولید شد و کمترین مقدار زمانی به دست آمد که عصاره فلفل زرد به محیط کشت افزوده شد و این افزایش ارتباط معناداری با میزان کارتنوئید دارد. به-طوری‌که ضریب همبستگی بین میزان تولید کوآنزیم Q_{10} در حضور رنگ‌های مختلف عصاره‌های فلفل و میزان کارتنوئید در رنگ‌های مختلف عصاره‌های فلفل برابر با 0/96 بود. این بدین‌معناست که تغییرات میزان کوآنزیم Q_{10} در حضور عصاره فلفل می‌تواند به میزان کارتنوئیدها و پیش‌سازهای آنها ارتباط داشته باشد که با استفاده از متانول استخراج شده‌اند. این عصاره بر وزن خشک سلولی نیز تأثیرگذار بود و سبب افزایش آن شد. افزایش وزن خشک سلولی به این دلیل اهمیت دارد که میزان تولید کوآنزیم Q_{10} با میزان وزن خشک سلولی رابطهٔ مستقیم دارد [22].

برای پاسخ‌دادن به این پرسش که عصاره فلفل در فاز لگاریتمی تأثیری بیشتر دارد یا در فاز سکون، عصاره کارتنوئیدی فلفل قرمز در دو فاز به محیط کشت افزوده شد. افزودن عصاره کارتنوئیدی فلفل قرمز در فاز لگاریتمی، تأثیری بیشتر در افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} نسبت به زمانی که این عصاره در فاز سکون افزوده شد، داشت. همین تأثیر درباره وزن خشک سلولی هم مشاهده شد. بدین‌صورت هنگامی که عصاره فلفل در فاز لگاریتمی به محیط کشت افزوده شد، میزان وزن خشک سلولی بعد از 48 ساعت اندکی بیشتر از زمانی بود که عصاره در فاز سکون افزوده شد. این می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که کارتنوئیدها و پیش‌سازهای کارتنوئیدی موجود در عصاره فلفل بر بیومس سلولی تأثیر گذاشت و سبب شد وزن خشک سلولی و متعاقباً تولید کوآنزیم Q_{10} افزایش یابد. ازاین‌رو، می‌توان عصاره کارتنوئیدی فلفل دولمه‌ای را به‌عنوان پیش‌ساز مناسبی برای افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} معرفی کرد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]

سپاسگزاری: با سپاس فراوان از گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه الزهرا درباره امکانات مرتبط با دستگاه HPLC

منابع

1. Kawamukai M (2009) Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. *Biotechnol Appl Biochem* 53: 217-226

2. Cluis CP, Pinel D, Martin VJ (2012) The Production of coenzyme Q10 in microorganisms. *Subcell Biochem* 64:303-26. doi: 10.1007/978-94-007-5055-5_15.

3. Kapoor P, Kapoor Kh (2013) Coenzyme Q10-a novel molecule .*JIASM* 14(1): 37-45

4. Ndikubwimana JD, Lee BH (2014) Enhanced production techniques, properties and uses of Coenzyme Q10. *Biotechnol Lett*. DOI:10.1007/s10529-014-1587-1

5. Choi JH, Ryu YW, Seo JH (2005) Biotechnological production and applications of coenzyme Q_{10}. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:9-15. Doi: 10.1007/s00253-005-1946-x

6. Jeya M, Moon HJ, Lee JL, Kim IW, Lee JK (2010) Current state of coenzyme Q_{10} production and its application. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1653-1663. Doi: 10.1007/s00253-009-2380-2

7. Park YC, Kim SJ, Choi JH, Lee WH, Park KM, Kawamukai M, Ryu YW, Seo JH (2005) Batch and fed-batch production of Coenzyme Q_{10} in recombinant *E.coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Gluconobacter suboxydans». Appl Microbiol Biotechnol* 67:192-196. Doi: 10.1007/s00253-004-1743-y

8. Cluis CP, Ekins A, Narcross L, Jiang H, Gold ND, Burja AM, Martin VJJ (2011) Identification of bottlenecks in *E.coli* engineered for the production of CoQ10. *Metabol Engin* 13:733-744

9. Cluis CP, Burja AM, Martin VJJ (2007) Current prospects for the production of coenzyme Q_{10} in microbes. *Trends Biotechnol* 25:514-21. Doi: 10.1016/j.tibtech.2007.08.008

10. Tian Y, Yue T, Yuana Y, Somab PK, Williams P, Machadob P, Fub H, Kratochvilc R, Weib C, Loa Y (2010) Tobacco biomass hydrolysate enhances coenzyme Q10 production using photosynthetic *Rhodospirillum rubrum*

. *Biores Technol* 101(20):7877–7881

11. Bule M, Singhal R (2009) use of carrot juice and tomato juice as natural precursors for enhanced production of ubiquinone-10 by *Pseudomonas diminuta* NCIM2865 Food Chem 116: 302-305

12. Qiu L, Wang W, Zhong W, Zhong L, Fang J, Li X, Wu S, Chen J (2011) Coenzyme Q10 production by Sphingomonas sp. ZUTE03 with novel precursors isolated from tobacco waste in a two-phase conversion system J Microbiol Biotechnol 21(5):494-502

13. Dixson D, Boddy CN, Doyle RP (2011) Reinvestigation of CoQ10 isolation from *Sporidiobolus johnsonii*. Chem Biodivers 8: 1033-1051

14. Arimpoor R, Natarajan R, Menon K (2015) Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability. J Food Sci Technol 52(3):1258–1271

15. Yan N, Liu Y, Gong D, Zhang H,Zhang Z (2015) Solanesol: a review of its resources, derivatives, bioactivities, medicinal applications, and biosynthesis. Phytochem Rev 14(3):403-417

16. Campos M, Gomez K, Ordonez Y (2013) Polyphenols, ascorbic acid and carotenoids contents and antioxidant properties of

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]

Habanero Pepper (*Capsicum chinense*) Fruit. Food Nutrition Sci 4: 47-54

17- Zhang D, Hamauzu Y (2003) Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. J Food Agri and Environ 1(2): 22-27

18- Roth K (2014) The Biochemistry of Peppers. Chemie in unserer Zeit/Wiley-VCH. DOI: 10.1002/chemv.201400031

19- Moghadami F, Fooladi J, Hosseini R (2019) Introducing a thermotolerant *Gluconobacter japonicus* strain, potentially useful for coenzyme Q_{10} production. Folia Microbiol 64(4): 471-479. doi: 10.1007/s12223-018-0666-4.

20- Moghadami F, Fooladi J, Hosseini R, Kalantari M (2021) Optimization of coenzyme Q10 production by Gluconobacter japonicus FM10 using response surface methodology. J Appl Biotechnol Rep 8(2): 172- 179

21- Taylor S (1992) A model for predicting tea quality from the carotenoid and chlorophyll composition of fresh green tea leaf. J Sci Agri 58: 185-191

22- Ha SJ, Kim SY, Seo JH, Oh DK, Lee JK (2007) Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for Coenzyme Q_{10} production by *Agrobacterium tumefaciens*. Appl Microbiol Biotechnol 74:974-980. Doi: 10.1007/s00253-006-0744-4

23- Omolo M, Wong Z, Mergen A, Hastings J, Le N (2014) Antimicrobial properties of chili peppers. Infect Dis Ther 2: 4-10. http://dx.doi.org/10.4172/2332-0877.1000145

24- Ozgur M, Ozcan T, Akpinar-Bayizit A, Yilmaz-Ersan L (2011) Functional compounds and antioxidant properties of dried green and red peppers. African J Agri Research 6(25): 5638-5644

25- Dorantes L, Colmenero R, Hernandez H, Mota L, Jaramillo ME (2000) Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. Int J Food Microbiol 57: 125-128.

26- Yamasaki S, Asakura M, Neogi SB, Hinenoya A, Iwaoka E (2011) Inhibition of virulence potential of *Vibrio cholerae* by natural compounds. Indian J Med Res 133: 232-239.

27- Careaga M, Fernández E, Dorantes L, Mota L, Jaramillo ME, et al. (2003) Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. Int J Food Microbiol 83:331-335.

28- Jones NL, Shabib S, Sherman PM (1997) Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett 146: 223-227.

29- Rani S, Saxena N (2013) Antimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum L.*). Glob J Pharmacol 7 (1): 87-90

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

The Effect of Pepper Extract on Coenzyme Q_{10} Production by *Gluconobacter japonicus* FM10

Foozieh Moghadami*

Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

Received: 2020/4/14 Accepted: 2020/10/4

fouziehm@yahoo.com
P.B:19395-4697

Abstract:
Coenzyme Q_{10} (CoQ_{10}) is a component of the respiratory chain that is responsible for generating energy by transmitting electrons. Today, due to the growing demand for CoQ_{10}, its production is increasing. In this study, the effect of extract containing carotenoid of bell pepper as a precursor was investigated on CoQ_{10} production by *Gluconobacter japonicus* FM10. For this purpose, at first, the total carotenoid was extracted from four colors of bell peppers and then the minimum inhibitory concentration of these extracts was measured. In the next step, the effect of extracts was investigated on CoQ_{10} production in two phases of the exponential and stationary. The results showed that CoQ_{10} production was increased in the presence of the bell pepper extract (4.1 mg / L in the presence of red bell pepper extract). In fact, 1.5 times more than when no extract was added. Adding red pepper extract in the exponential phase also increased CoQ_{10} to 4.9 mg / L, while adding it in the stationary phase did not affect CoQ_{10} increasing. Therefore, it can be concluded that the carotenoid in bell pepper extract increases the production of CoQ_{10} by affecting cell growth and increasing it. Therefore, the carotenoid extract of bell pepper can be introduced as a suitable precursor to increase CoQ_{10} production.

Keywords: Coenzyme Q_{10}, *Gluconobacter japonicus*, Carotenoid, Bell Pepper

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.8.3]