

اثر عصاره فلفل بر تولید کوآنزیم Q₁₀ توسط *Gluconobacter japonicus* FM10

فوزیه مقدمی *

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

تاریخ پذیرش: 1399/7/13

تاریخ دریافت: 1399/1/26

fouziehm@yahoo.com

صندوق پستی: 19395-4697

چکیده:

کوآنزیم Q₁₀ جزئی از زنجیره تنفسی است که با انتقال الکترون، سبب تولید انرژی می شود. امروزه به دلیل تقاضای روزافزون کوآنزیم Q₁₀، تولید آن رو به افزایش است. در این پژوهش، اثر عصاره حاوی کارتنوئید استخراج شده از فلفل دولمه‌ای به عنوان یک پیش ساز جهت افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ با *Gluconobacter japonicus* FM10 بررسی شد. بدین منظور، 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 Q₁₀ در دو فاز رشد سکون و لگاریتمی به صورت مجزا بررسی شد. نتایج نشان داد که تولید کوآنزیم Q₁₀ در حضور عصاره فلفل دولمه‌ای افزایش پیدا کرد (4/1 میلی گرم در لیتر در حضور عصاره فلفل دولمه‌ای قرمز). درواقع 1/5 برابر بیش از زمانی که هیچ عصاره‌ای افزوده نشد. افزودن عصاره فلفل قرمز در فاز لگاریتمی نیز سبب افزایش کوآنزیم Q₁₀ تا 4/9 میلی گرم بر لیتر شد، درحالی که افزودن آن در فاز سکون بر تولید کوآنزیم Q₁₀ اثری نداشت. از این رو می توان نتیجه گرفت که کارتنوئیدهای موجود در عصاره فلفل با تأثیر بر رشد سلولی و افزایش آن سبب افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ می شود. بنابراین، می توان عصاره کارتنوئیدی فلفل دولمه‌ای را به عنوان پیش ساز مناسبی جهت افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ معرفی کرد.

کلید واژگان: کوآنزیم Q₁₀، *Gluconobacter japonicus*، کارتنوئید، فلفل دولمه‌ای

مقدمه

کوآنزیم Q، یک ترکیب لیپوفیلیک شبه ویتامین 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 ایزوپروپونوئیدی 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 Q₁₀ یا Ubiquinone نامیده می‌شود. به دلیل تمایل بالای این ملکول در جذب الکترون، کوآنزیم Q₁₀ نقش‌های فراوانی در سلول دارد. از جمله می‌توان به نقش آن به عنوان واسطه در زنجیره تنفسی اشاره کرد که سبب انتقال الکترون و تولید انرژی می‌شود [2]. کوآنزیم Q₁₀ می‌تواند الکترون‌ها و بارهای اضافی موجود بر ملکول‌های اکسیژن فعال را جذب و اثر آنتی‌اکسیدانی خود را بر رادیکال‌های آزاد اکسیژن اعمال کند. از این رو کاربردهای فراوانی یافته است. امروزه به عنوان 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 بیوستز این ملکول بسیار پیچیده بوده و در موجودات مختلف متفاوت است، ولی به‌طور کلی دو مرحله جداگانه دارد: مرحله بیوستز حلقه کوئینونی و مرحله بیوستز زنجیره ایزوپروپونوئیدی. پس از سنتز، هر دو جزء با هم پیوند می‌خورد و ملکول اصلی حاصل می‌شود

[4]. تولید کوآنزیم Q₁₀ 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 بیوستز آن نیز پیچیده است، هزینه سنتز شیمیایی و نیمه-شیمیایی آن بالا است. بنابراین، فرایند تخمیر میکروبی به دلیل ارزان‌تر بودن 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 Q₁₀ را تولید کنند، راهکارهایی نیز برای افزایش تولید وجود دارد [6]. از جمله 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 به عنوان پیش‌ساز به محیط کشت میکروارگانیسم‌های تولیدکننده کوآنزیم Q₁₀ افزوده می‌شود یا پیش‌ساز تولید حلقه کوئینونی هستند [12,13] یا زنجیره ایزوپروپونوئیدی [11].

فلفل دولمه‌ای با نام علمی *Capsicum annuum* ترکیبات شیمیایی مختلفی را شامل می‌شود که عمدتاً از سه گروه اسانس‌های روغنی، موم‌ها و رنگدانه‌ها تشکیل شده‌اند. در میان آنها برخی از ترکیبات ساختار ایزوپروپونوئیدی 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

production culture را با سرعت 12000 rpm به مدت 20 دقیقه سانتیفریوژ 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. بدین صورت که ابتدا 900 میکرولیتر از حلال هگزان - 2 پروپانول با نسبت 3-5 به پلت حاصل از سانتیفریوژ افزوده و پس از 5 دقیقه با سرعت 12000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتیفریوژ شد. بعد از سانتیفریوژ، بخش بالایی حاوی کوآنزیم Q₁₀ 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 Q₁₀ باقی بماند. برای سنجش کوآنزیم Q₁₀ 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 Q₁₀ در طول موج 275 نانومتر شناسایی شد [8]. برای ترسیم منحنی استاندارد، نمونه کوآنزیم Q₁₀ استاندارد نیز با شماره CAS 303-98-0 و مخصوص HPLC با درجه خلوص بالای 98 درصد از شرکت سیگما-آلد ریچ خریداری و استفاده شد.

تعیین وزن خشک سلولی: هم‌زمان با استخراج کوآنزیم Q₁₀، 1 میلی‌لیتر از محیط کشت را نیز جهت تعیین وزن خشک سلولی با سرعت 12000 rpm به مدت 20 دقیقه سانتیفریوژ 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-

موجود در فلفل دولمه‌ای می‌توان لوتئین، کپسانتین، بتاکاروتن، زنازانتین، ویالوزانتین و غیره را نام برد [18]. در این پژوهش فلفل دولمه‌ای به این دلیل به‌عنوان پیش‌ساز کوآنزیم Q₁₀ انتخاب شد که یکی از سبزیجاتی است که مقادیر زیادی از انواع کارتنوئید دارد. از این رو اثر عصاره حاوی کارتنوئید استخراج‌شده از چهار رنگ فلفل دولمه‌ای به‌عنوان یک پیش‌ساز بر تولید کوآنزیم Q₁₀ 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 KH₂PO₄ و 0/55 گرم بر لیتر MgSO₄. 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 180 rpm در انکوباتور نگهداری شدند [20]. کوآنزیم Q₁₀ بعد از 40 ساعت در ابتدای فاز سکون استخراج شد.

استخراج و سنجش کوآنزیم Q₁₀: برای استخراج کوآنزیم Q₁₀ ابتدا 1 میلی‌لیتر از محیط کشت 40 ساعته

ای، از روش استخراج متانولی و سنجش با دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. بدین منظور 0/5 گرم از هر رنگ از پودر فلفل وزن شده و 25 میلی لیتر متانول به آن افزوده شد و به مدت 10 دقیقه با استفاده از همزن به صورت مکانیکی به هم زده شد. محتوای فلاسک ها با سرعت 10000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد. جذب محلول های حاصل در سه طول موج 470، 653 و 666 نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و مقدار کارتنوئید کل با فرمول های زیر محاسبه شد [21].

$$\begin{aligned} \text{Chlorophyll a} &= 15.65 A_{666} - 7.34 A_{653} \\ \text{Chlorophyll b} &= 27.05 A_{653} - 11.21 A_{666} \\ \text{Total Carotenoid} &= (1000 A_{470} - 2.86 \\ &\quad \text{Chlorophyll a} - 12.92 \text{ Chlorophyll b}) / 245 \end{aligned}$$

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC)

عصاره های فلفل: عصاره های حاصل بعد از حلال پراکنی با نسبت 1600 میکروگرم در 1 میلی لیتر اتانول حل و برای ایجاد غلظت های مختلف استفاده شدند. برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. سوسپانسیون میکروبی در سالین نرمال با غلظت $10^8 \text{ CFU/ml} \times 1/5$ معادل 0/5 مک فارلند تهیه و استفاده شد. از عصاره های فلفل سبز، زرد، نارنجی و قرمز، جداگانه با غلظت های 1600، 800، 400، 200، 100، 50، 25، 12، 6، 3 میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. چون عصاره ها، در محیط کشت به تنهایی سبب ایجاد یک رنگ می شوند که در غلظت های بالاتر بیشتر مشهود است، چاهک های 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 عصاره های فلفل بر تولید کوآنزیم Q₁₀: به فلاسک های تلقیح شده، میزان 200 میکروگرم بر میلی لیتر از هر کدام از عصاره های فلفل سبز، زرد، نارنجی و قرمز

جداگانه افزوده شد. فلاسک ها در گرمخانه 30 درجه سانتیگراد با سرعت 180rpm به مدت 40 ساعت گرماگذاری شدند و سپس میزان وزن خشک سلولی و کوآنزیم Q₁₀ تولیدی اندازه گیری شد.

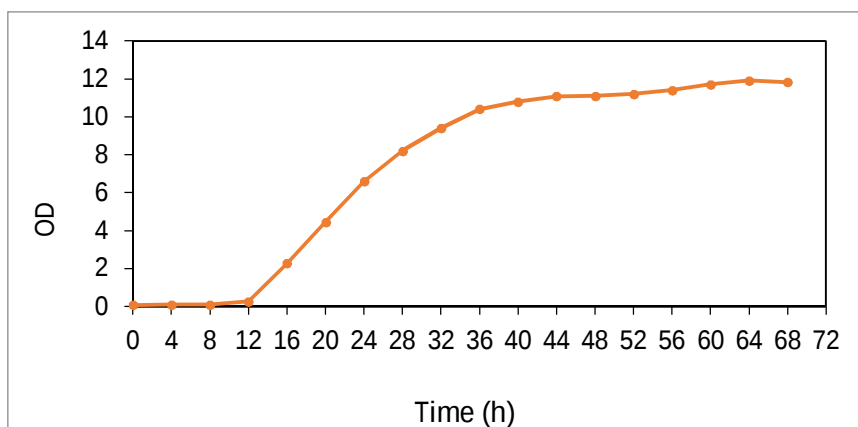
بررسی اثر عصاره فلفل بر تولید کوآنزیم Q₁₀ در فازهای رشد لگاریتمی و سکون: برای انجام دادن این بررسی، فلاسک های کشت به سه سری تقسیم شدند: به سری اول از فلاسک ها از ابتدا 200 میکروگرم بر میلی لیتر (غلظت Sub MIC) از عصاره فلفل قرمز افزوده شد و سپس تلقیح انجام گرفت. به سری دوم از فلاسک ها بعد از 40 ساعت رشد، وقتی باکتری به فاز سکون رسید، این مقدار عصاره افزوده شد و سری سوم هم به عنوان شاهد، بدون افزودن عصاره تلقیح شد. فلاسک ها 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 کوآنزیم Q₁₀ تولیدی اندازه گیری شد.

نتایج

سنجش کوآنزیم Q₁₀: تولید کوآنزیم Q₁₀ در فلاسک های 250 میلی لیتری حاوی 100 میلی لیتر محیط کشت با pH 6/5 و دمای 30 درجه سانتیگراد با سرعت 180rpm انجام شد. کوآنزیم Q₁₀ بعد از 40 ساعت در ابتدای فاز سکون استخراج شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد کوآنزیم Q₁₀، میزان تولید کوآنزیم Q₁₀ توسط سویه FM10 به دست آمد که برابر بود با 2/7 میلی گرم بر لیتر. وزن خشک سلولی آن 5/3 گرم بر لیتر و ظرفیت ویژه تولید نیز 0/5 میلی گرم بر گرم وزن خشک به دست آمد. ظرفیت ویژه تولید، مقدار کوآنزیم Q₁₀ را در هر گرم از وزن خشک سلولی نشان می دهد. درواقع، ظرفیت ویژه کوآنزیم Q₁₀ از تقسیم مقدار کوآنزیم Q₁₀ بر وزن خشک سلولی به دست می آید [22]. تولید کوآنزیم Q₁₀ توسط سویه FM10 قبل از افزودن عصاره های فلفل (2/7 میلی -

رسید (شکل 1) از این رو در تمام آزمایش‌ها، 40 ساعت پس از تلقیح، کوآنزیم Q₁₀ استخراج شد.

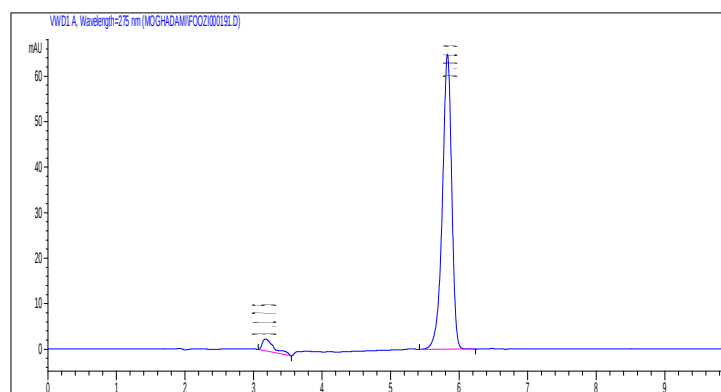
گرم بر لیتر) به عنوان مقدار شاهد در آزمایش‌های بعدی که عصاره فلفل افزوده شد، استفاده شد. سویه FM10 در محیط کشت تولید در مدت 40 ساعت به فاز رشد سکون



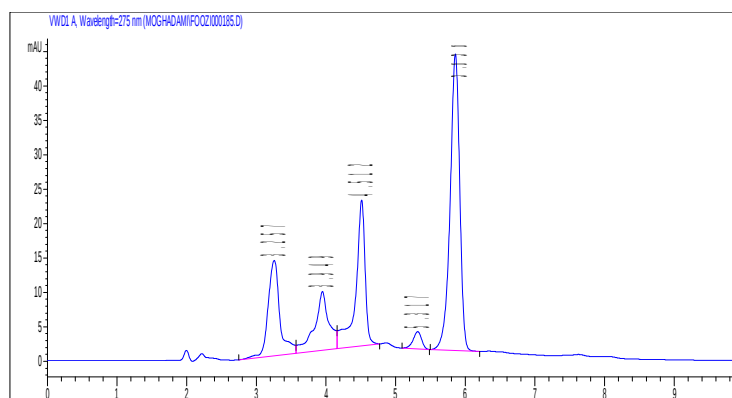
شکل 1 منحنی رشد سویه FM10 در فلاسک 250 میلی‌لیتری حاوی سوربیتول به عنوان منبع کربن و عصاره مخمر و پپتون به عنوان منبع نیتروژن، pH اولیه محیط 6/5، دمای گرماگذاری 30 درجه سانتیگراد و طول مدت کشت 72 ساعت.

زمان بازداری 5/8 دقیقه ترسیم شده است. شکل 3 نیز پیک کوآنزیم Q₁₀ را نشان می‌دهد که به واسطه سویه FM10 تولید شده که در زمان بازداری 5/8 دقیقه ترسیم شده است.

شناسایی کوآنزیم Q₁₀ به وسیله دستگاه HPLC و در طول موج 275 نانومتر انجام گرفت. شکل 2 پیک کوآنزیم Q₁₀ استاندارد را نشان می‌دهد که از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شده بود. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود پیک کوآنزیم Q₁₀ استاندارد در



شکل 2 کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کوآنزیم Q₁₀ استاندارد. پیک موجود در زمان بازداری 5/8 دقیقه نشان‌دهنده کوآنزیم Q₁₀ است. کوآنزیم Q₁₀ استاندارد از شرکت Sigma-Aldrich با CAS number: 303-98-0 (≥98%- HPLC) است.



شکل 3 کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کوآنزیم Q₁₀ 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 Q₁₀ است.

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.

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 فرمول‌های ذکرشده جاگذاری شد و میزان کارتنوئید کل موجود در هر رنگ از فلفل دولمه‌ای به دست آمد. مقدار

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

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.

حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره‌های فلفل:

نتایج نشان داد که در غلظت‌های 400 میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالاتر از آن، برای هر 4 رنگ فلفل سبز، زرد، نارنجی و قرمز، هیچ رشدی در چاهک‌ها مشاهده نشد از این‌رو، غلظت 400 میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان MIC معرفی شد. سویه FM10 در حضور غلظت‌های

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 Q₁₀ در حضور عصاره فلفل: تولید
 کوآنزیم Q₁₀ در حضور عصاره‌های فلفل انجام گرفت و نتایج نشان داد که بیشترین میزان تولید کوآنزیم Q₁₀ 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 Q₁₀ سبب شد و عصاره فلفل سبز و زرد در مقام‌های سوم و چهارم قرار داشتند. میزان تولید کوآنزیم Q₁₀ 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 Q₁₀ است. جدول 3 میزان کوآنزیم Q₁₀ 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 Q₁₀ 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 Q₁₀ 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 Q₁₀ و وزن خشک سلولی در نبود حضور عصاره فلفل است.

فلفل دولمه‌ای	کوآنزیم Q ₁₀ (mg/l)	وزن خشک سلولی (g/l)	ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q 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 Q₁₀ بیشترین تأثیر را داشت، برای بررسی اثر عصاره بر تولید کوآنزیم Q₁₀ 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 بی‌تأثیر بودن

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.

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

بحث

اثر ضد میکروبی فلفل عموماً به ماده‌ای به نام کپسایسین 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 aeruginosa*, *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

دست آمد که عصاره فلفل زرد به محیط کشت افزوده شد و این افزایش ارتباط معناداری با میزان کارتنوئید دارد. به-طوری که ضریب همبستگی بین میزان تولید کوآنزیم Q₁₀ در حضور رنگ‌های مختلف عصاره‌های فلفل و میزان کارتنوئید در رنگ‌های مختلف عصاره‌های فلفل برابر با 0/96 بود. این بدین معناست که تغییرات میزان کوآنزیم Q₁₀ 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 Q₁₀ با میزان وزن خشک سلولی رابطه 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 Q₁₀ 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 Q₁₀ افزایش یابد. ازاین‌رو، می‌توان عصاره کارتنوئیدی فلفل دولمه‌ای را به‌عنوان پیش‌ساز مناسبی برای افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ معرفی کرد.

قرمز بین 3200mg/100g DW-100 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 واریته‌ای از مکزیکی بوده است [16]. میزان کارتنوئید کل موجود در فلفل‌های دولمه‌ای رنگی که در این مطالعه بررسی شد، بین 417-112 به دست آمد. بیشترین مقدار کارتنوئید 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 Q₁₀ از 6 به 29 و 24 میلی-گرم بر لیتر شد. در این پژوهش بیان شده است که دلیل افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ 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 *Rhodospirillum rubrum* سبب افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ تا دو برابر شد [10]. در سویه معمولی 43 میلی‌گرم بر لیتر کوآنزیم Q₁₀ تولید می‌کرد، افزودن سولانسل و 4- هیدروکسی بنزوئیک اسید تولید را به 442 میلی‌گرم بر لیتر رساند. سولانسل پیش‌ساز تولید زنجیره ایزوپروپونوئیدی و 4- هیدروکسی بنزوئیک اسید، پیش‌ساز تولید حلقه کوئینونی است [12].

نتایج این پژوهش نشان داد تولید کوآنزیم Q₁₀ در حضور عصاره کارتنوئیدی فلفل تا 1/5 برابر افزایش یافت. بیشترین مقدار کوآنزیم Q₁₀ در حضور عصاره فلفل قرمز (4/1 میلی‌گرم بر لیتر) تولید شد و کمترین مقدار زمانی به

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 Q₁₀ 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. Dixon 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

سپاسگزاری: با سپاس فراوان از گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه الزهراء 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 Q₁₀. *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 Q₁₀ 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 Q₁₀ 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*

- 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, Akpınar-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
- 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 Q₁₀ 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 Q₁₀ production by *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:974-980. Doi: 10.1007/s00253-006-0744-4

The Effect of Pepper Extract on Coenzyme Q₁₀ 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 Q₁₀ (CoQ₁₀) is a component of the respiratory chain that is responsible for generating energy by transmitting electrons. Today, due to the growing demand for CoQ₁₀, its production is increasing. In this study, the effect of extract containing carotenoid of bell pepper as a precursor was investigated on CoQ₁₀ 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 CoQ₁₀ production in two phases of the exponential and stationary. The results showed that CoQ₁₀ 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 CoQ₁₀ to 4.9 mg / L, while adding it in the stationary phase did not affect CoQ₁₀ increasing. Therefore, it can be concluded that the carotenoid in bell pepper extract increases the production of CoQ₁₀ by affecting cell growth and increasing it. Therefore, the carotenoid extract of bell pepper can be introduced as a suitable precursor to increase CoQ₁₀ production.

Keywords: Coenzyme Q₁₀, *Gluconobacter japonicus*, Carotenoid, Bell Pepper