



ПРОДУКЦИЈА НА КАПСАИЦИН ВО КУЛТУРИ ОД ПИПЕРКА (*CAPSICUM ANNUUM L.*) ВО УСЛОВИ *IN VITRO*

Колева-Гудева Лилјана¹, Рафајловска Весна², Спасеноски Мирко³

¹ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури,
Гоце Делчев б.б., 2400 Сирумица, Република Македонија, e-mail: liljanak@isc.ukim.edu.mk

²Технолошко-медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј",
и. фах 580, МК-1001 Скопје, Република Македонија
e-mail: vesna@erebl.mf.ukim.edu.mk

³Природно-математички Факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј"
и. фах 162, МК-1001 Скопје, Република Македонија
e-mail: mirkoms@iunona.pmf.ukim.edu.mk

Вовед

Од сите групи на секундарни метаболити, од биолошко активни компоненти на видот *Capsicum annuum L.*, водечко место имаат алкалоидите капсаициноиди. Тоа се прости фенолни амиди, се среќаваат исклучиво во претставници на родот *Capsicum*, и го даваат лутиот вкус на пиперката [Govindaraj, 1986].

Капсаициноидот, N-[4-хидрокси-3-метокси бензил]-8-метил-нон-транс-6-анамид, е силен и стабилен кристален алкалоид, и иако е без боја, вкус и мирис, тоа е едно од најлутите познати соединенија, а според податоците на De Witt [1999], човековото непце го забележува и во разредување од 1:17 000 000.

Клиничките испитувања, *in vivo* и *in vitro*, покажуваат дека биолошкиот потенцијал на капсаициноидот потекнува од неговата неверојатно силна и стабилна структура на секундарен метаболит - алкалоид, а оттаму доаѓа и неговото повеќекратно дејство: смирување на болка, антимикробно, антибактериско, антиканцерогено, анестетско, аналгетско, цитостатичко, хемотераписко и како фармаколошки агенс [Davison, 2000].

Досегашните научни истражувања покажуваат дека методот на *in vitro* култури на растителни клетки и ткива наоѓа голема примена кај повеќе видови од родот *Capsicum*, а литературните податоци ја потврдуваат примената на најразлични типови на експлантати [George, 1996]. Во поново време истражувањата се насочени кон испитување на продукцијата на некои секундарни метаболити кај видови од родот *Capsicum*. Во овој поглед, примената на методот на *in vitro* култури на растителни клетки и ткива е насочен во правец на зголемување на биосинтезата на секундарните метаболити во услови *in vitro* [Sasson, 1991].

Експериментален дел

За изедување на органогенезата на пиперка во услови *in vitro* најпрво семето од сортите куртовска капија и златен медал беше стерилизирано на следниот начин: семето беше проплакнато во дестилирана вода и се оставаше да имбибира 2-3 часа; потоа површински беше стерилизирано 15 секунди во 70% етанол; 10 минути во 1% Изосан-G; а на крај се проплакнаше неколку пати во стерилна вода. Вака стерилизираното семе беше поставено на 1/2 MS [Murashige, T. and Skoog, F., 1962] минерален раствор на 'ртење. Кога младите понизи достигнуа големина од 3-5 cm (по 21-25 дена), од нив беа изолирани почетните експлантати и истите беа поставени на хормонален MS медиум. Како почетни експлантати беа користени апикални пупки со големина 1-3 mm и 1/3 делови од котиledonите со големина 3-5 mm. Сите поставени култури, од двете сорти на пиперка, беа чувани на контролирани услови во клима комора и тоа на: температура од 25±1°C; релативна влажност од 50%; фотопериодизам од 16 h светло/ 8 h темно, и интензитет на светлина од 50 μmol·m⁻²·s⁻¹.

Од *in vitro* услови беше земен растителен материјал од 4 различни култури на пиперка: култура на изданоци; култура на калуси од меристемите и од котиledonите; и култура на котиledonите. Всушност, анализирана е содржината на капсаицин во *in vitro* култури на седум различни MS хормонални подлоги и тоа: MS + 5,0 mg/l KIN; MS + 5,0 mg/l BAP; MS + 5,0 mg/l ZEA; MS + 5,0 mg/l 2,4-D; MS + 0,5 mg/l NAA+5,0 mg/l BAP; MS + 0,5 mg/l NAA+10,0 mg/l KIN; MS + 1,0 mg/l IAA+10,0 mg/l BAP.

Примероците за анализа на содржината на капсаицинонот беа исушени до воздушно сува маса (на собна температура 6-7 дена). Дополнителната влага е корегирана со сушење на пробите во термостат до константна тежина, на температура од 105 ° C и времетраење од 5 часа. Содржината на капсаицинон во култури на изданоци, котиледони и калуси од пиперка беше одредена со отчитувања на апсорбанцијата на спектрофотометар тип Vagan на бранова должина од 281 nm. на екстрактите добиени со мацерирање на *in vitro* материјалот од пиперка (0,1-0,5 g) со 96% етанол во водена бања на температура од 40°C и за време од 5 часа. Во согласност со вредностите за апсорбанцијата опчитани во етанолните екстракти на пиперка и вредностите на апсорбанцијата на етанолните раствори со одредена концентрација на стандардот капсаицинон е одредена содржината на капсаицинон во културите од пиперка изразени како μg капсаицинон / g проба.

Резултати и дискусија

Покрај испитуваните хормонални MS медиуми во култура на изданоци, за сортите куртовска капија и златен медал, беше поставена и контролна група на MS медиум без присуство на хормони, според која беа согледани разликите на хормоналниот третман во биосинтезата на капсаицинонот во услови *in vitro*. Добиените резултати (табела 1) потврдуваат дека на секој хормонален MS медиум содржината на капсаицинонот е поголема од контролната група и за двете испитувани сорти.

Табела 1. Содржина на капсаицинон во култури на изданоци од пиперка

MS (mg/l)	содржина на капсаицинон во свежа маса			
	куртовска ($\mu\text{g/g}$)	капија (%)	златен ($\mu\text{g/g}$)	медал (%)
контрола	213,10±56,80	0,0212±0,0057	271,31±60,15**	0,0270±0,0060**
5,0 KIN	622,19±7,84*	0,0625±0,0007*	992,62±59,92**	0,0992±0,0060**
5,0 BAP	828,57±35,82*	0,0828±0,0035*	796,17±19,27	0,0795±0,0019
5,0 ZEA	585,37±18,17*	0,0585±0,0018*	668,50±34,46	0,0668±0,0340
5,0 2,4-D	269,00±28,34	0,0269±0,0028	545,38±30,41	0,0544±0,0030
0,5 NAA+5,0 BAP	315,68±4,50	0,0315±0,0007	794,00±4,51	0,0797±0,0005
0,5 NAA+10,0 KIN	848,52±19,60*	0,0848±0,0019*	733,39±61,17	0,0733±0,0061
1,0 IAA+10,0 BAP	337,10±33,08	0,0341±0,0026	321,29±13,71	0,0320±0,0013

*Вредностите во секоја колона (група) означени со *,**,*** се сигнификантно различни (t-тест на зависни примероци, $p < 0,05$); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; $\pm S.D.$, $n = 2$.

За можноста на биосинтеза на капсаицинон во калусни култури, на сортите куртовска капија и златен медал, беа анализирани две калусни групи и тоа: култура на калуси од меристем (табела 2) и култура на калуси од котиледони (табела 3). Резултатите за содржината на капсаицинонот во калусни култури третирано со различен хормонален состав, покажаа дека иако калусите формирани на апикалните пупки и котиледоните имаат различна структура, не се разликуваат многу по нивната на содржина на капсаицинон.

За сите испитувани групи, важи констатацијата дека различниот хормонален третман различно влијае врз синтезата на капсаицинонот во услови *in vitro*, а секоја различна култура има различен потенцијал во синтезата на овој секундарен метаболит. Процентуалното изразување на содржината на капсаицинонот нормално ја следи динамиката изразена во $\mu\text{g/g}$.

Табела 2. Содржина на капсаицинон во *in vitro* култура на калуси формирани од меристеми на пиперка

MS (mg/l)	содржина на капсаицинон во свежа маса			
	куртовска ($\mu\text{g/g}$)	капија (%)	златен ($\mu\text{g/g}$)	медал (%)
5,0 KIN	285,57±31,84*	0,0285±0,0031*	351,06±176,16	0,0350±0,0177
5,0 BAP	537,73±6,78**	0,0537±0,0007**	476,04±1,88	0,0475±0,0002
5,0 ZEA	430,87±42,79*	0,0430±0,0042*	748,08±16,23*	0,0474±0,0016*
5,0 2,4-D	315,93±32,43*	0,0314±0,0033*	350,97±103,08	0,0350±0,0105
0,5 NAA+5,0 BAP	248,19±20,83	0,0245±0,0020	312,49±36,08	0,0313±0,0034
0,5 NAA+10,0 KIN	96,04±15,92**	0,0083±0,0004**	225,63±56,20	0,0225±0,0056
1,0 IAA+10,0 BAP	256,59±9,99	0,0256±0,0009	334,92±38,92	0,0034±0,0038

*Вредностите во секоја колона (група) означени со *,**,*** се сигнификантно различни (t-тест на зависни примероци, $p < 0,05$); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; $\pm S.D.$, $n = 2$.

Табела 3. Содржина на капсаицин во *in vitro* култура на калуси формирани на котиледони од пиперка

MS (mg/l)	содржина на капсаицин во свежа маса			
	куртовска капија		златен	медал
	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)
5,0 KIN	359,74 \pm 135,23	0,0434 \pm 0,0034	108,00 \pm 2,30*	0,0107 \pm 0,0002*
5,0 BAP	371,57 \pm 16,03	0,0370 \pm 0,0014	341,11 \pm 19,85*	0,0341 \pm 0,0019*
5,0 ZEA	740,31 \pm 8,77*	0,0735 \pm 0,0021*	987,47 \pm 32,90**	0,0523 \pm 0,0597**
5,0 2,4-D	487,30 \pm 24,16	0,0480 \pm 0,0028	205,43 \pm 29,04*	0,0204 \pm 0,0028*
0,5 NAA+5,0 BAP	230,51 \pm 4,72*	0,0225 \pm 0,0007*	309,34 \pm 22,31*	0,0307 \pm 0,0024*
0,5 NAA+10,0 KIN	371,48 \pm 0,45	0,0370 \pm 0,0000	131,74 \pm 3,62*	0,0131 \pm 0,0003*
1,0 IAA+10,0 BAP	581,52 \pm 61,67	0,0595 \pm 0,0035	558,12 \pm 84,30*	0,0557 \pm 0,0060

*Вредностите во секоја колона (група) означени со *, **, *** се сигнификантно различни (t-тест на зависни примероци, $p < 0,05$); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; \pm S.D., $n = 2$.

Како и во сите претходно анализирани култури, така и во култура на котиледони, се синтетизира капсаицин во услови *in vitro*, и тоа различните хормонални третмани различно влијаат врз биосинтезата на овој значаен алкалоид. И во овој случај водечко место во стимулацијата на синтезата на капсаициноидите во услови *in vitro* имаат цитокинините BAP и ZEA, а за разлика од другите испитувани групи, комбинацијата на ауксин/citoкинин 1,0 mg/l IAA / 10,0 mg/l BAP, кај котиледоните покажа силна стимулација во биосинтезата на капсаициноидите (табела 4).

 Табела 4. Содржина на капсаицин во *in vitro* култури на котиледони од пиперка

MS (mg/l)	содржина на капсаицин во свежа маса			
	куртовска капија		златен	медал
	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)
5,0 KIN	189,85 \pm 6,15*	0,0193 \pm 0,0006*	330,15 \pm 46,05	0,0329 \pm 0,0046
5,0 BAP	516,67 \pm 23,03	0,0516 \pm 0,0016	467,65 \pm 54,75	0,0467 \pm 0,0054
5,0 ZEA	430,87 \pm 42,79	0,0430 \pm 0,0420	437,92 \pm 10,83	0,0437 \pm 0,0010
5,0 2,4 D	513,77 \pm 24,86	0,0513 \pm 0,0024	439,80 \pm 75,73	0,0439 \pm 0,0075
0,5 NAA+5,0 BAP	281,95 \pm 76,06	0,0279 \pm 0,0072	314,66 \pm 31,46	0,0312 \pm 0,0025
0,5 NAA+10,0 KIN	576,46 \pm 7,26	0,0576 \pm 0,0007	299,91 \pm 10,76	0,0295 \pm 0,0010
1,0 IAA+10,0 BAP	753,22 \pm 3,74*	0,0752 \pm 0,0003*	457,45 \pm 6,15	0,0348 \pm 0,1088

*Вредностите во секоја колона (група) означени со *, **, *** се сигнификантно различни (t-тест на зависни примероци, $p < 0,05$); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; \pm S.D., $n = 2$.

Способноста за биосинтеза на капсаицин во култура на пиперка во услови *in vitro* е евидентна. Во култура на изданоци синтезата на капсаицин е најголема (213-992 $\mu\text{g/g}$), нешто помала е во култура на котиледони (189-753 $\mu\text{g/g}$), а најмала во култура на калуси (96-740 $\mu\text{g/g}$). Цитокинини ја стимулираат синтезата на капсаицин во услови *in vitro*, а BAP и ZEA имаат најголемо влијание. Од комбинациите IAA/BAP најмногу ја поттикнува биосинтезата на капсаицин (256-753 $\mu\text{g/g}$). Биосинтеза на капсаициноидите настанува во услови *in vitro*, но нивната продукција сигурно се одвива по некои алтернативни патишта, кои сеуште не се во целост откриени [Anchondo, 2002].

Референци

1. Anchondo, R., Changes in the levels of capsaicin during callus growth of jalapeño peppers as a result of the presence of biosynthetic precursors and microbial elicitors. *Proceedings of the 16th International Pepper Conference, Tampico, Tamaulipas* (2002), Mexico.
2. Davison, M.W., Capsaicin - Molecular Expressions. *Phytochemical Gallery, Florida State University* (2000), National High Magnetic Field Laboratory.
3. De Witt, D., The nature of capsaicin. *The Chile Pepper Encyclopedia* (1999).
4. George, E.F., Plant Propagation by tissue culture. *In Practises. Exegetics Ltd. Edington* (1996), England.
5. Govindarajan, V.S., Capsicum- production, technology, chemistry and quality - Part III. Chemistry of the colour, aroma and pungency stimul. *CRC, Critical Review in Food Science and Nutrition* (1986) **24 (3)** pp. 254-355.
6. Murashige, T., and Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Planatarum* **15** (1962) pp. 473-497.
7. Sasson A., Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects. *CHIEAM, Options Mediterraneennes* **14** (1991) pp. 59-74.