Archive of SID

بیوراکتورها و استفاده بهینه از پتانسیل زیست بوم گیاهان دارویی و متابولیت‌های ثانویه گیاهی

هانا رمشی[۱]

چکیده

بکارگیری سلول‌ها، بافت و اندام‌های گیاهی به منظور تولید ترکیبات طبیعی و نوترکیبِ دارای ارزش تجاری، توجه بسیاری را طی دهه‌های گذشته به خود جلب کرده است. تولید محصولات نوترکیب از طریق کشت سوسپانسیون سلول گیاهی چندین مزیّت نسبت به سیستم‌هایی با میزبانی پستانداران و میکروبی ارائه می‌دهد از جمله: ایمنی ذاتی، پایداری شرایط تولید بهینه، و ظرفیت آن‌ها برای تغییرات پس از ترجمه پروتئین. باتوجه به افزایش روزافزون جمعیّت جهان و ضرورت استفاده بهینه از ظرفیت‌های طبیعت؛ همچنین به منظور تامین سایر نیازها، همچون تولید مواددارویی و شیمیایی از گیاهان، زمین‌های قابل کشت باید بطور مؤثرتری استفاده شوند. از این رو گسترش تکنیک‌های مدرن برای بهبود کیفیت گیاهان، جهت استفاده بهتر از زمین‌ها به منظور برطرف کردن احتیاجات، ضروری است. زیست فناوری فرصتی مناسب برای بررسی و هدایت سلول، بافت و اندام و یا کل ارگانیسم، بوسیله رشد آن‌ها در شرایط کشت درون شیشه ای (اینویترو)، برای بدست آوردن ترکیبات مطلوب را فراهم می‌کند. این مسئله با تلاش و همکاری بیولوژیست-های سلولی و مهندسین شیمی در راستای به کارگیری "بیوراکتورها" امکان‌پذیر شده است. سیستم کشت بیوراکتور مزیّت‌هایی را نسبت به سیستم کشت کلاسیک ارائه می‌دهد و نیز هزینه تولید و زمان به مقدار زیادی کاهش می‌یابد؛ محدودیت فصلی کشت ازمیان برداشته شده وکیفیت محصول و وسعت کشت می‌تواند کنترل شود. اولین نمونه‌های گزارش شده در سال۱۹۹۰ از تولید پروتئین نوترکیب با استفاده ازکشت‌های سوسپانسیونی سلول گیاه، سرم آلبومین انسانی نوترکیب وکلرامفنیکل استیل ترانسفراز بود. امروزه بیش از ۳۰۰ گزارش از تولید پروتئین‌های درمانی برپایه گیاه (آنتی بادی‌ها، آنتی ژن‌ها، واکسن‌ها، هورمون‌ها، عوامل رشد و پروتئین‌های خون انسان) تحت مراحل مختلف تحقیق و توسعه، وجود دارد.

واژگان کلیدی: بیوراکتور، متابولیت‌های ثانویه، گیاهان دارویی، سوسپانسیون سلولی، محیط زیست.

۱ . کارشناس ارشد زیست فناوری گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، Najmehrameshi@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاهان دارویی منبع تمام نشدنی از داروهای زندگی بخش برای اکثر جمعیت جهان محسوب می شوند. بیوراکتورها فرصتی مناسب برای بررسی و هدایت سلول‌ها ، بافت و اندام و یا کل ارگانیسم، بوسیله رشد آن‌ها درشرایط کشت درون شیشه (اینویترو)، برای بدست آوردن ترکیبات مطلوب را فراهم می‌کند[۱].گیاهان بعنوان منبع کربوهیدرات‌ها، پروتئین-ها و چربی‌ها جهت تغذیه و همچنین سرپناه مورد نیاز انسان‌ها می‌باشند. علاوه بر آن، گیاهان منبع ارزشمندی از متابولیت‌های ثانویه هستند که به عنوان دارو، مواد شیمیایی کشاورزی، طعم دهنده‌ها، عطرها و خوشبوکننده‌ها، رنگ‌ها، افزودنی‌های غذایی وآفت‌کش‌های زیستی استفاده می‌شوند[۵]. از زمان افزایش جمعیت جهان فشارهای زیادی روی زمین‌های قابل کشت برای تولید غذا و تأمین احتیاجات وجود دارد. بنابراین به منظور تامین سایر نیازها، همچون تولید مواد دارویی و شیمیایی از گیاهان، زمین‌های قابل کشت باید بطور مؤثرتری استفاده شوند. از این رو گسترش تکنیک-های مدرن برای بهبود گیاهان، جهت استفاده بهتر از زمین‌ها به منظور برطرف کردن احتیاجات ضروری است. توسعه و سازگاری کشت سلول گیاهی و روش‌های کشت اندام، سبب تولید محصولات گیاهی در یک مقیاس وسیع شده است. این مسئله با تلاش و همکاری بیولوژیست‌های سلولی و مهندسین شیمی در راستای به کارگیری "بیوراکتورها" امکان پذیر شده است. پیشرفت‌ها در تحقیقات زیست شناسی مولکولی بعد تازه‌ای در امر کشت آزمایشگاهی گیاهان برای بهبود آن-ها و افزایش عملکرد و تولید محصولات جدید از طریق مهندسی ژنتیک گیاهی فراهم ساخته است. تولید محصولات نوترکیب از طریق کشت سوسپانسیون سلول گیاهی چندین مزیّت نسبت به سیستم‌هایی با میزبانی پستانداران و میکروبی ارائه می‌دهد از جمله : ایمنی ذاتی، زیست پردازشی، و ظرفیت آن‌ها برای تغییرات پس از ترجمه پروتئین. یکی از موارد مهم کاربرد بیوراکتورها تولید پروتئین‌های نوترکیب درکشت‌های سوسپانسیون سلول گیاهی است که دراین مقاله به شرح آن پرداخته می‌شود[۴].

کشت سلول گیاهی بعنوان منبع تولید متابولیت‌های ثانویه[۳]

سلول‌های گیاهی دارای توانایی توتی پتانسی هستند، بدین معنا که هر سلول مورد کشت، از آنجایی که اطلاعات ژنتیکی کامل را حفظ کرده، بنابراین توانایی تولید دامنه‌ای از مواد شیمیایی مربوط به گیاه مادری را دارند. مزایای کشت سلول های گیاهی نسبت به تولید سیستم کشاورزی قدیمی عبارتند از:

- مستقل بودن از تغییرات فصلی و جغرافیایی و عوامل مختلف محیطی- فراهم آوردن یک سیستم تولیدی تعریف شده برای تولید پیوسته محصولات از لحاظ کمی وکیفی- فراهم آوردن امکان تولید ترکیبات جدیدی مثل پروتئین‌های نوترکیب که درگیاه والد یافت نمی‌شوند- امکان بازیابی و تولید کارآمد وسرعت بالای تولید- فراهم آوردن اطلاعات زیستی در جهت تولید ترکیبات جدید از پیش ماده‌های ارزان.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. مربوط به متابولیت‌های ثانویه به دست آمده از گیاهان مختلف توسط کشت سلولی

High yields of secondary products

Product	Plant species	Yield (% D.W.)	Reference
Rosmarinic acid	*Sa. officinalis*	36.0	Hippolyte et al. (1992)
Rosmarinic acid	*Col. blumei*	21.4	Ulbrich et al. (1985)
Anthroquinones	*M. citrifolia*	18.0	Zenk et al. (1975)
Shikonin	*L. erythrorhizon*	12.4	Fujita (1988)
Berberine	*Th. minus*	10.6	Kobayashi et al. (1988)
Jatrorhizine	*Berberis wilsonae*	10.0	Breuling et al. (1985)
Anthocyanins	*Pe. frutescens*	8.9	Zhong et al. (1994)
Berberine	*C. japonica*	7.5	Matsubara et al. (1989)
Diosgenin	*Diosc. deltoidea*	3.8	Sahai and Knuth (1985)
Sanguinarine	*P. somniferum*	2.5	Park et al. (1992)
Serpentine	*Cath. roseus*	2.2	Zenk et al. (1977)

Adapted from Ravishankar and Ramachandra Rao (2000).

با این همه، هنوز مشکلات زیادی درتولید متابولیت‌ها ازطریق کشت بافت سلولی وجود دارد مانند بی‌ثباتی لاین‌های سلولی، عملکردپایین، رشدآهسته و ... .یکی از مهمترین رویکردها برای فائق آمدن بر این مشکلات، استفاده از ریشه‌های گیاهان درکشت سلولی است که در ادامه به شرح آن پرداخته خواهد شد. همچنین جهت بهینه سازی شرایط برای افزایش تولید متابولیت‌ها چندین راهکار خواهد شد.

کشت ریشه‌های موئین برای ترکیبات دارویی[۲]

آگروباکتریوم رایزوژنز توانایی تحریک ایجاد ریشه‌های مویین در یک محدوده از گیاهان میزبان را دارد که می تواند در مطالعه روی ترکیبات دارویی مشتق شده از آن منابع گیاهی موثر باشد. مجاورت بافت گیاهی در کنار این باکتری موجب القاء ریشه‌های موئین در بافت گیاهی می‌شود. ریشه‌های موئین عمدتاً تمایل به رشد سریع بدون نیاز به منابع خارجی اکسین‌ها دارند [۵]. چندین عامل در عملکرد متابولیت‌های ثانویه داروها (ترکیبات دارویی) حاصل از کشت ریشه‌های موئین تأثیرگذارند: موادغذایی ، الیسیتورها و تبدیلات زیستی پیش ماده‌ها از این موارد.

کشت ریشه نابه‌جا[۱]

ریشه های گیاهان، مخزن بزرگی از ترکیبات فعال زیستی هستند که شامل تنوع بسیار زیادی ازمتابولیت‌ها و پروتئین های ناب[۱] می باشند و بنابراین بعنوان مکانی بی‌نظیر از فعالیت متابولیت‌های تمام گیاه است. اگر سلول‌ها به حالت غیر تمایز یافته باقی بمانند برخی ترکیبات تولید نمی‌شود. باتوجه به این واقعیت، کشت ریشه نابه جا در سطح بزرگ بیوراکتور بعنوان یک روش جذاب برای تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی و غذاهای اصلی مورد توجه قرارگرفته است. موارد مطالعاتی از کشت ریشه‌های نابجای گیاهان دارویی با استفاده از بیوراکتور به این قراراست: ۱- کشت ریشه‌های

۱ Bona fide

www.SID.ir

Archive of SID

نابه‌جای توت هندی[۱] ۲-کشت ریشه‌های نابه‌جای سرخارگل یا کیناسه[۲] ۳-کشت ریشه‌های نابه‌جای هوفاریتون یا علف چای[۳] ۴- کشت ریشه نابه‌جای جین سینگ[۴].

کشت بیو راکتور[۴]

قسمت اصلی کنترل بیوراکتور ، توانایی زیرنظرگرفتن (مونیتورینگ) تغییرات فرایندهای مهم مانند pH، دما،اکسیژن محلول، نرخ جذب اکسیژن (OUR)، نرخ تولید دی اکسیدکربن (CER) و گرانش ویژه است. در واقع، جهت طراحی یک سیستم بیوراکتور مناسب جهت یک پروسه زیستی خاص ، مطالعات به منظور سیستم بیولوژیکی مانند رشد سلولی ، متابولیسم و بیان دیگر محصولات موردنیاز است که به منظور درک نیازهای اساسی سلول یا ریشه در محیط فیزیکی و شیمیایی است. عنوان شده که یکی از موانع اصلی در استفاده تجاری ازکشت اندام، بافت و سلول جهت تولید تجاری مولکول‌های فعال زیستی مهم ، میزان عملکرد پایین است. بهینه سازی پارامترهای فرآیند، می‌تواند باعث افزایش تولید شود. جهت افزایش تولید، راهکارهایی همچون الیسیتورها، تأمین پیش ماده، سیستم کشت دو مرحله‌ای یا دوفازی، مهندسی متابولیک و تکنولوژی بیوراکتور جامع پیشنهاد شده است. از بین تلاش‌های مختلف مشاهده شده که الیسیتورها یک استراتژی مؤثر به منظور افزایش تجاری ترکیبات مهم زیستی مانند: آنتراگوئینون،گینزنوزید، پاکلیتاکسال و دیگرتاکسول‌ها است.

۲.راهبردهای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه درکشت سلول گیاهی

Strategies to enhance production of secondary metabolites in plant cell cultures
1. Obtaining efficient cell lines for growth
2. Screening of high-growth cell line to produce metabolites of interest
a. Mutation of cells
b. Amenability to media alterations for higher yields
3. Immobilization of cells to enhance yields of extracellular metabolites and to facilitate biotransformations
4. Use of elicitors to enhance productivity in a short period of time
5. Permeation of metabolites to facilitate downstream processing
6. Adsorption of the metabolites to partition the products from the medium and to overcome feedback inhibition
7. Scale-up of cell cultures in suitable bioreactors

بسیاری از فاکتورهای محیطی و اجزای سازنده محیط کشت سلول گیاهی دارای نقش تعیین کننده‌ای در رشد و تجمع متابولیت‌های ثانویه هستند. ازجمله : میزان قند- میزان نیترات- میزان فسفات- تنظیم کننده های رشد -پیش ماده‌های

۱ Morinda citrifolia
۲ Echinacea
۳ Hypericum perferatum
۴ P.ginseng

www.SID.ir

Archive of SID

مسیرهای بیوسنتزی- بهینه سازی محیط کشت- دما-۲- روشنایی[۱]- pH محیط- هم زدن و هوادهی[۲]- الیسیتورها[۳] یا پاتوژنها-افزایش نفوذ پذیری سلول‌ها[۴]- بیوترانسفورماسیون[۵] برای تولید متابولیت های ثانویه دلخواه.

انواع بیورآکتورها[۴]

اساس مطالعات بیوراکتور برای سلول های گیاهی شامل سه موضوع علمی و عملی مهم مرتبط با طراحی و عملیات بیوراکتور می باشد:۱- ارزیابی رشد سلول و تولید متابولیت۲- آنالیز و مدل سازی دینامیک کشت، شامل هماهنگی بیوسنتز متابولیت و جداسازی آن۳- مطالعه جریان یافتن، مخلوط شدن و جابه جایی مواد در بین فازهای جامد، مایع و گاز به منظور تعریف شاخص ها در طراحی بیوراکتور و تولید انبوه.

تاکنون ۷نوع بیوراکتورطراحی و استفاده شده اند[۴]: ۱- بیورآکتورهای تانک همزن: (STR) ۲- بیورآکتورهای استوانه حباب دار : (BCR) ۳- بیورآکتورهای هوا بالابر: (ALR) ۴- بیورآکتورهای غشایی : (MBR) ۵ - بیورآکتورهای مواج : (WB) ۶- بیورآکتورهای مینیاتور : (MB) ۷- بیورآکتورهای مخزن دوار : (RDR)

۳.مقایسه انواع بیوراکتورهادرکشت سلولی گیاهان و شاخصه‌های مؤثر در ارزیابی آن‌ها

نوع بیوراکتور	اکسیژن رسانی	تنش هیدرودینامیک	همزدن	حجیم رسانی	محدودیت ها
همزن مکانیکی	زیاد	خیلی زیاد	خیلی یکنواخت	مشکل	مرگ سلول، امکان آلودگی
ستون حباب دار	متوسط	کم	غیر یکنواخت	آسان	ایجاد مناطق مرده
هوابالابر	زیاد	کم	یکنواخت	آسان	در دانسیته بالا ایجاد مناطق مرده
مخزن دوار	زیاد	کم	یکنواخت	مشکل	همزدن غیر یکنواخت در حجم های بالا

مهندسی بیوراکتور برای تولید پروتئین نوترکیب درکشت‌های سوسپانسیونی سلول گیاهی[۳]

برخلاف سیستم‌های گیاه کامل، کشت‌های سلولی گیاهی تطبیق شده می‌توانند تحت شرایط کنترل شده در بیوراکتورها برای بدست آوردن عملکرد محصول تجدیدپذیر رشد یابند. و همچنین از آنجا که ارگانیسم‌های نوترکیب درون تأسیسات

۱ Illumination
۲ Agitation and aeration
۳ Elicitation
۴ Permabilization
۵ Biotransformation

www.SID.ir

Archive of SID

تولید محدود شده‌اند، نگرانی‌های زیست محیطی مربوط به مهاجرت ژن کاهش می یابد. یک سیستم کشت سلول گیاه ایده‌آل برای تولید پروتئین نوترکیب دارای ویژگی‌هایی ازجمله :

۱- نرخ رشد ویژه بالا ۲- توانایی بالای بیان پروتئین ۳- فعالیت پایین پروتئولیتیک آندوژن (درون زا) ۵- تولید کم متابولیت‌های ثانویه (مانند فنولیک‌ها وکوئینون‌ها که می‌توانند با آمینواسیدهای پروتئین نوترکیب واکنش داده و از طریق اکسیداسیون باعث تغییرات فیزیکوشیمیایی، ساختار و خصوصیات بیولوژیکی و فرآیندهای تصفیه پیچیده پروتئین شوند). ۶- قابلیت اصلاح بعد از ترجمه ۷- الگوی گلیکوزیلاسیون یکنواخت و صحیح و تاخوردگی مناسب پروتئین ۸- توده‌های کوچک و پراکنش همگن در بیوراکتور و ۹- ثبات ژنتیکی لاین سلولی در دراز مدت.

نتیجه گیری

امروزه همه می‌دانیم یکی از مشکلات جدی بشرآینده کم آبی و خشکسالی و کمبود منابع آب‌های زیرزمینی خواهد بود، که این مسئله کشاورزی و به تَبَع آن امنیت غذایی بشر را تهدید خواهدکرد. این خطر برای ایران جدی تر خواهد بود؛ چراکه کشورایران روی نوار خشکی کره زمین قرار گرفته و روز به روز باتوجه به تغییر شرایط اقلیمی و نیز عدم استفاده صحیح از منابع آبی موجود روبه کم آبی و فرسایش زمین‌های کشاورزی می رود. افزایش جمعیت جهان و نیاز غذایی روزافزون و کمبود زمین‌های مناسب برای کشت و کار نیز سبب شده فشارهای زیادی روی زمین‌های قابل کشت برای تولید غذا و تأمین احتیاجات وارد گردد. از طرفی ما می‌دانیم بسیاری از گیاهان علاوه بر ارزش غذایی دارای خواص دارویی هستند و منبع ارزشمندی از متابولیت‌های ثانویه بوده که به عنوان دارو، مواد شیمیایی،کشاورزی، طعم دهنده‌ها، عطرها و خوشبوکننده‌ها، رنگ‌ها، افزودنی‌های غذایی و آفت‌کش‌های زیستی استفاده می‌شوند. بنابراین به منظور تأمین همه این نیازها، زمین‌های قابل کشت باید بطور مؤثرتری استفاده شوند. از این روگسترش تکنیک‌های پیشرفته برای افزایش بهره‌وری از منابع موجود، جهت استفاده بهتر از زمین‌ها در راستای برطرف کردن احتیاجات و نیز افزایش کیفیت متابولیت‌های تولید شده توسط گیاهان ضروری است. پیشرفت‌ها در تحقیقات زیستی و سلولی بعد تازه‌ای در امر کشت آزمایشگاهی گیاهان برای بهبود آن‌ها و افزایش عملکرد و تولید محصولات جدید از طریق بهینه سازی سلولی گیاهی فراهم ساخته است.

توسعه و سازگاری کشت سلول گیاهی و روش‌های کشت اندام در راستای به کارگیری "بیوراکتورها" امکان پذیر شده است. کشت سلول‌های گیاهی در بیوراکتورها نسبت به روش کشت معمولی و سنتی مزایای زیادی دارد که درمتن مقاله به آن اشاره شد.

کشت های سوسپانسیونی ضدعفونی شده آزمایشگاهی سلول‌ها، بافت‌ها یا ارگان‌های گیاهی تحت شرایط کنترل شده محیطی درطول ۵۰ سال گذشته ابتدائاً به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی با ارزش مانند شیکونین و تاکسول گسترش یافته است[۶]. بکارگیری سلول‌ها، بافت و اندام‌های گیاهی به منظور تولید ترکیبات طبیعی و نوترکیبِ دارای ارزش تجاری، توجه بسیاری را طی دهه‌های گذشته به خود جلب کرده است. امروزه با پیشرفت این تکنیک و ساخت

www.SID.ir

Archive of SID

بیوراکتورهای مختلف علاوه بر متابولیت‌های موجود درگیاه می‌توان با استفاده از تکنیک‌های نظیر بیوراکتورها اقدام به تولید پروتئین های نوترکیب نمود.[۶] امروزه بیش از ۳۰۰ گزارش از تولید پروتئین‌های درمانی برپایه گیاه (آنتی بادی‌ها، آنتی ژن‌ها، واکسن‌ها، هورمون‌ها، عوامل رشد و پروتئین‌های خون انسان) تحت مراحل مختلف تحقیق و توسعه، وجود دارد. به تازگی یک محصول نوترکیب واکسن حیوانی در برابر ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) حاصل از کشت‌های سلول گیاه توتون تراریخت توسط باکتری داوآگروساینس درفوریه سال ۲۰۰۶ تولیدشد. درحال حاضر، اکثر پروتئین‌های نوترکیب ازجمله زیست داروهای بشر با استفاده از سیستم‌های یوکاریوتی سنتی تولید می‌شوند مانند سلول‌های پستانداران(۴۵٪) بخصوص سلول های تخمدان موش بزرگ چینی(CHO)، مخمر(۱۵٪) و سلول‌های حشرات و سیستم-های باکتریایی. تولیدمحصولات نوترکیب از طریق کشت سوسپانسیون سلول گیاهی چندین مزیّت نسبت به سیستم‌های سنتی میزبان پستانداران و میکروبی ارائه میدهد. مانند: ایمنی ذاتی (آن‌ها نمی‌توانند ویروس‌ها و پاتوژن‌های پستانداران را انتشاردهند)، زیست پردازش مقرون به صرفه (ارزان بودن موادشیمیایی تعریف شده محیط کشت) و ظرفیت آن‌ها برای تغییرات پس از ترجمه پروتئین (تولیدگلیکوپروتئین‌ها و پروتئین‌های چند واحدی پیچیده، نشان دادن شباهت به همتایان بومی از نظر ساختارهای N گلیکان درمقایسه با سلول‌های پستانداران).

منابع

۱-Tripathi.L and Tripathi.J.N.۲۰۰۳. Role of biotechnology in medicinal plant . Tropical Journal of Pharmaceutical Research

۲-..sajc.L- GrubisicD-Vunjak.G-۱۹۹۹. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochemical engineering journal.

۳- Aharoni.A & Galili.G -۲۰۱۱. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. Current Opinion in Biotechnology

۴- Huang.T.K.McDonald.K .۲۰۰۹. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. . Biochemical Engineering Journal.

۵. ج.هاپکینز ویلیام.(۱۹۹۷). مقدمه ای بر فیزیولوژی گیاهی.جلد۱و۲-ترجمه : احمدی،علی-احسان زاده،پرویز-جباری،فرهاد. چاپ دوم.انتشارات دانشگاه تهران.

۶. اچ.اس.چاولا.(۲۰۰۰). اصول زیست فناوری گیاهی. ترجمه: فارسی،محمد و ذوالعلی،جعفر. چاپ سوم. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

www.SID.ir