دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۳، صفحه ۳۸۸-۳۷۷ (۱۳۹۵)

بررسی اثرات مقدار اینوکلوم و سرعت هوادهی بر تولید بیوماس و اسید شیکوریک در کشت ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در بیوراکتور ستون حباب‌دار

فتح‌الله احمدی[۱]، احمد معینی[۲*] و سجاد رشیدی منفرد[۳]

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پست الکترونیک: moieni_a@modares.ac.ir

۳- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۴

چکیده

در این پژوهش، ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در بیوراکتور ستون حباب‌دار ۱۰۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت WPM مایع کشت و تأثیر مقادیر اینوکلوم (۳، ۶ و ۹gl^{-1}) و سرعت‌های هوادهی (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴vvm) روی میزان تولید بیوماس و اسید شیکوریک بررسی شدند. صفات وزن تر، وزن خشک و مقدار اسید شیکوریک ریشه‌های مویین بعد از ۳۰ روز اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار بیوماس (۱۶/۴g l^{-1} وزن تر و ۲/۰۸۴g l^{-1} وزن خشک) و اسید شیکوریک (۱۶/۷۴mg g^{-1} DW) در مقدار اینوکلوم ۶ g l^{-1} تولید شده است. نتایج حاصل از بررسی اثر سرعت هوادهی بر تولید بیوماس و اسید شیکوریک نیز نشان داد که بیشترین میزان تولید وزن تر (۱۵/۴g l^{-1}) و وزن خشک (۲/۴۶۷g l^{-1}) در سرعت هوادهی ۰/۴ vvm و بیشترین میزان تولید اسید شیکوریک (۱۲/۷۴ mg g^{-1} DW) در سرعت هوادهی ۰/۲ vvm بدست آمده است. به‌طور کلی مقدار اینوکلوم و سرعت هوادهی نقش مهمی در میزان رشد و نمو ریشه‌های مویین در بیوراکتور ستون حباب‌دار داشتند و برای بهینه کردن تولید بیوماس و متابولیت ثانویه باید به این عوامل توجه کرد.

واژه‌های کلیدی: سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)، متابولیت ثانویه، گیاه دارویی، کشت درون شیشه‌ای.

مقدمه

گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)، با تعداد کروموزوم ۲۲=۲x=۲n، یک گیاه دارویی علفی، چندساله و متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) و بومی آمریکای شمالی است که به‌طور وسیع در بیشتر نقاط دنیا برای اهداف تجاری کشت می‌شود (Jeong *et al.*, 2009). این گیاه در سال‌های اخیر، به دلیل نقش تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی محبوبیت جهانی پیدا کرده‌است و یکی از پرفروش‌ترین گیاهان دارویی در بیشتر کشورهای توسعه یافته است (Kayser & Quax, 2007). عصاره این گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدقارچی دارد. اسید شیکوریک به‌عنوان یکی از مهمترین مواد مؤثره این گیاه، دارای خواص دارویی متعددی مانند خاصیت ضدسرطانی، ضدچاقی، ضدویروسی، ضددیابت و آنتی‌اکسیدانی برای انسان است و ضمناً با توجه به نقش آن

Archive of SID
www.SID.ir

در مهار آنزیم HIV intergrase، فعالیت ضدویروس ایدز (HIV) نیز برای آن گزارش شده‌است (Lee & Scagel, 2013؛ Schlernitzauer *et al*., 2013). این ماده در ریشه و اندام هوایی گیاه سرخارگل تولید می‌شود. تولید اقتصادی این گیاه به دلیل عواملی ازجمله آلودگی مواد گیاهی با حشرات، قارچ‌ها، باکتری‌ها، تفاوت در میزان ترکیب‌های فعال از گیاهی به گیاه دیگر و نیز از سالی به سال دیگر، طولانی بودن دوره رشد و نیز مشکلات برداشت ریشه، با مشکل مواجه می‌باشد (Romero *et al*., 2009). بنابراین استفاده از راهکارهای جایگزین برای تولید متابولیت های ثانویه در این گیاه ضروری به نظر می‌رسد. کشت ریشه های مویین، به‌دلیل سرعت رشد زیاد و نامحدود، کوتاه بودن زمان دوبرابر شدن، عدم نیاز به محیط کشت حاوی هورمون و نور، پایداری ژنتیکی بالا و امکان تولید محصولات با ارزش در زمان کم با بازده زیاد، به‌عنوان سیستم بسیار امیدبخش برای تولید متابولیت‌های ثانویه ریشه‌ای در شرایط درون شیشه‌ای مطرح شده است (Banerjee *et al*., 1998؛ Kittipongpatana *et al*., 1998؛ Sivakumar, 2006). از ویژگی‌های منحصر به فرد این روش، تولید پایدار و قابلیت افزایش تولید متابولیت های ثانویه است و یک منبع دائمی برای تولید مواد فعال گیاهی محسوب می‌شود (Bourgaud *et al*., 2001). حتی در مواردی که متابولیت‌های ثانویه فقط در قسمت‌های هوایی یک گیاه تجمع می‌یابند، کشت ریشه‌های مویین قادر به سنتز و تجمع آن متابولیت ها نیز می باشد (Bakkali *et al*., 1997؛ Liu *et al*., 1999). تحقیقات مختلفی روی القای ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل انجام شده (Liu *et al*., 2006؛ Wang *et al*., 2006) و تأثیر عوامل مختلف بر تولید بیوماس و متابولیت های ثانویه در سیستم ارلن مایر مطالعه شده‌است (Abbasi *et al*., 2007؛ Abbasi *et al*., 2012؛ Liu *et al*., 2012؛ Abdoli *et al*., 2013) ولی فقط یک گزارش در مورد کشت ریشه های مویین این گیاه در بیوراکتور وجود دارد که در آن ریشه‌های مویین در بیوراکتور هوا بالابر تغییر یافته (Modified Air-lift Bioreactor) کشت شده‌اند (Abbasi *et al*., 2009).

تولید انبوه بیوماس در بیوراکتورها، یک چالش کلیدی برای تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین است (Baque *et al*., 2012). بیوراکتورها، به‌طور معمول، شامل یک مخزن با شرایط استریل و حاوی محیط کشت مایع و مجهز به سیستم ورود و خروج هوا هستند (Paek *et al*., 2005). بیوراکتور ستون حباب‌دار از یک ظرف استوانه‌ای تشکیل شده که یک پخش‌کننده هوا در کف آن قرار دارد که هوا یا مخلوطی از گازها را در محیط کشت برای دو هدف یعنی هوادهی و اختلاط محیط کشت مایع آزاد می‌کند (Choi *et al*., 2006). تأمین اکسیژن، اختلاط و گردش محیط کشت مایع از مهمترین محدودیت‌های طراحی بیوراکتور و افزایش حجم کشت محسوب می‌شود (Eibl & Eibl, 2008) که باید به‌منظور کنترل مورفولوژی گیاهی و رشد بیوماس و تولید متابولیت‌های ثانویه در بیوراکتور، کنترل شوند (Yesil Celiktas *et al*., 2010). از طریق بهینه کردن عوامل مختلف می‌توان تولید بیوماس و متابولیت ثانویه در این نوع بیوراکتور را بهبود بخشید. به‌عنوان مثال، تولید آلکالوئیدها در ریشه‌های مویین گیاه *Scopolia parviflora* در بیوراکتور ستون حباب‌دار از طریق بهینه کردن مدت زمان رشد، مقدار اینوکلوم اولیه و میزان هوادهی افزایش یافته است (Min *et al*., 2007).

به‌دلیل خواص دارویی ارزشمند گیاه سرخارگل و ارزش اقتصادی بالای آن، دستیابی به راهکارهایی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه آن حائز اهمیت می‌باشد. از این‌رو در این پژوهش، کشت ریشه‌های مویین این گیاه در یک بیوراکتور ستون حباب‌دار انجام شد تا ضمن بررسی تولید ریشه‌های مویین در این سیستم، اثرات مقدار اینوکلوم و سرعت هوادهی نیز بر تولید بیوماس و اسید شیکوریک بررسی شوند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) که از تلقیح ریزنمونه‌های برگی با اگروباکتریوم رایزوژنز سویه A_4 در شرایط آزمایشگاهی تولید (القاء) شده بودند (Abdoli *et al*., 2013) به‌عنوان مواد گیاهی اولیه برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد. ریشه‌های مویین القاء

Archive of SID
www.SID.ir

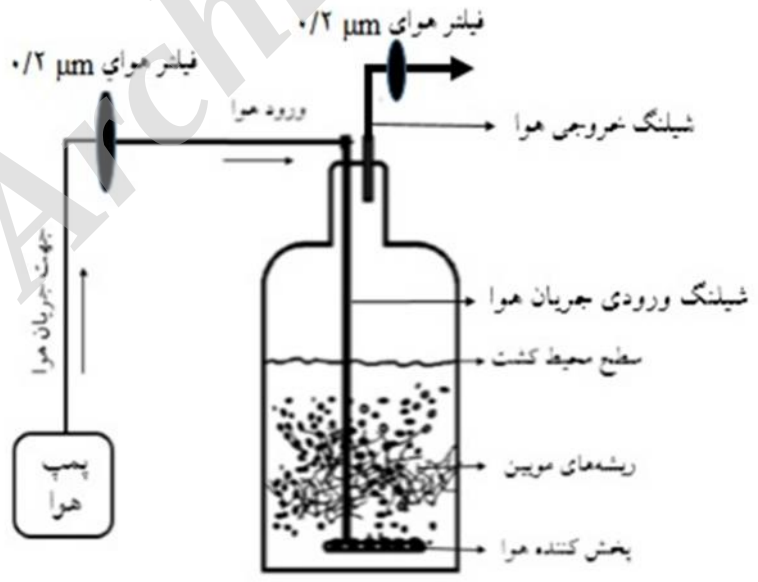
شده در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت WPM مایع روی شیکر (۱۱۰rpm) نگهداری می‌شدند. این ریشه‌ها حدود دو سال سن داشتند و طی این مدت در فواصل یک‌ماهه زیر کشت می‌شدند. این تحقیق در سال ۱۳۹۲ در آزمایشگاه کشت سلول و بافت گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

تکثیر ریشه‌های مویین برای تهیه مواد گیاهی مورد نیاز برای کشت در بیوراکتور

برای این منظور ریشه‌های مویین در ارلن مایرهای ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌لیتری، به‌ترتیب حاوی ۵۰ و ۱۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت WPM مایع، کشت شدند و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C و روی شیکر با دور ۰/۴۳۷g (۱۱۰rpm) قرار گرفتند و برای افزایش مقدار ریشه‌های مویین، زیر کشت‌های (Subculture) متوالی در فواصل زمانی ۲۱ روزه انجام شد.

ساخت بیوراکتور ستون حباب‌دار و کشت ریشه‌های مویین در آن

در این پژوهش از بیوراکتورهای ستون حباب‌دار دست‌ساز با حجم یک لیتر برای کشت ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل استفاده گردید. این بیوراکتورها با استفاده از ظروف شیشه‌ای استوانه‌ای (به ارتفاع ۱۵cm و قطر ۹cm) با حجم یک لیتر به‌عنوان مخزن بیوراکتور و شیلنگ‌های سیلیکونی (با قطر داخلی ۵mm) برای هوادهی کشت‌ها، ساخته شدند. برای ساخت بیوراکتور، منافذی در درب پلاستیکی ظروف شیشه‌ای ایجاد شد و بعد شیلنگ‌های سیلیکونی برای انجام هوادهی و همچنین خروج هوای اضافی از بیوراکتور، از این منافذ عبور داده شدند (شکل ۱). شیلنگ حامل جریان هوا برای انجام هوادهی در کف ظرف قرار گرفت و برای ایجاد حباب‌های ریز هوا، در انتهای آن از یک سر سمپلر ۱ میلی‌لیتری مشبک استفاده شد. هوای اضافی از طریق شیلنگ دیگر از بیوراکتور خارج گردید. برای تأمین هوادهی مورد نیاز از پمپ هوای آکواریوم استفاده گردید و برای تنظیم سرعت هوادهی از وسیله اندازه‌گیری جریان هوا (Air flow meter) استفاده شد. در مسیر ورودی هوا به بیوراکتور و خروجی آن، از فیلتر ۰/۲۲µm برای استریل کردن جریان هوا استفاده شد. برای کشت ریشه‌های مویین، بیوراکتور به اندازه نصف حجم خود (۵۰۰ میلی‌لیتر) از محیط کشت مایع استریل پر شد.



شکل ۱- بیوراکتور ستون حباب‌دار

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی تأثیر مقدار اینوکلوم بر تولید بیوماس و اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل با استفاده از بیوراکتور ستون حباب‌دار

برای تعیین میزان اینوکلوم مناسب جهت تولید بیوماس و اسید شیکوریک، سه وزن مختلف از ریشه‌های مویین (۳، ۶ و ۹g l^{-1}) در بیوراکتور ستون حباب‌دار ساخته شده، کشت شد. محیط کشت مورد استفاده شامل WPM (Woody Plant Medium) حاوی ۰/۱ mg l^{-1} هورمون IBA (Indole-3-Butyric Acid) (Abdoli, 2013) بود و هوادهی با سرعت ۰/۲vvm (Volume of air in Volume of medium per Minute) هوادهی انجام شد. کشت‌ها به مدت یک ماه در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C قرار گرفتند و بعد از یک ماه، میزان تولید بیوماس ریشه‌های مویین و اسید شیکوریک اندازه‌گیری شدند.

بررسی اثر سرعت هوادهی بر تولید بیوماس و اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل با استفاده از بیوراکتور ستون حباب‌دار

برای این منظور مقدار ۶g l^{-1} از ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل در بیوراکتورهای ستون حباب‌دار حاوی محیط کشت WPM مایع دارای ۰/۱mg l^{-1} هورمون IBA کشت شد و بعد بیوراکتورها با سه سرعت مختلف جریان هوا (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴vvm)، هوادهی شدند. کشت‌ها به مدت یک ماه در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C قرار گرفتند و بعد از یک ماه میزان تولید بیوماس و اسید شیکوریک اندازه‌گیری شدند.

صفات مورد مطالعه

وزن تر و وزن خشک

برای اندازه‌گیری وزن تر ریشه‌های مویین تولید شده، ابتدا ریشه‌ها با آب مقطر شسته شده و بعد آب سطحی آنها توسط دستمال کاغذی حذف شده و در نهایت وزن تر آنها اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک، ریشه‌های مویین به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰°C و در تاریکی قرار گرفته و بعد وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد (Abdoli *et al*., 2013).

شاخص رشد

برای تعیین شاخص رشد از رابطه زیر استفاده شد:

= شاخص رشد

وزن خشک اولیه/(وزن خشک اولیه–وزن خشک نهایی)

وزن خشک اولیه همان وزن خشک اینوکلوم بوده و وزن خشک نهایی، از طریق خشک کردن ریشه‌های مویین برداشت شده در انتهای دوره رشد بدست آمد.

حجم نهایی محیط کشت مایع داخل بیوراکتور

مقدار محیط کشت مایع داخل بیوراکتور در انتهای دوره رشد تا حدودی کاهش می‌یافت و این مقدار کاهش با سرعت هوادهی در ارتباط بود، از این‌رو حجم نهایی محیط کشت اندازه‌گیری شده و درصد کاهش آن محاسبه گردید.

مقدار اسید شیکوریک

برای عصاره‌گیری از ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول متانول و اسید فسفریک ۰/۱٪ (۳۰v/v: ۷۰) روی پودر خشک ریشه‌های مویین در ویال‌های ۲ میلی‌لیتر ریخته شد و بعد محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه حمام اولتراسونیک (Ultrasonic bath) قرار گرفت. در مرحله بعد، به مدت ۵min با سرعت ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ انجام شده و محلول روشناور (Supernatant) برای سنجش مقدار اسید شیکوریک برداشته شد.

برای اندازه‌گیری مقدار اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل، مقدار ۵۰µl از عصاره استخراج شده، به‌صورت دستی به دستگاه HPLC مدل Waters با ستون C18 (4.6×250mm) تزریق شد. فاز متحرک برای دستگاه به‌صورت ایزوکراتیک (Isocratic) (ثابت بودن نسبت حلال‌ها در طول زمان) شامل ۳۰٪ (v/v) استونیتریل و ۷۰٪ (v/v) آب حاوی اسید فسفریک ۰/۱٪ با سرعت جریان (Flow Rate) ۱/۷۵ml min^{-1} تنظیم شد و از

Archive of SID
www.SID.ir

آشکارساز (Detector) .U.V با طول موج ۳۳۰nm استفاده شد (Abdoli *et al*., 2013).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش‌ها به‌صورت مستقل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. هر تکرار از یک بیوراکتور ستون حباب‌دار تشکیل گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (Least Significant Difference) (LSD) انجام شد.

نتایج

تأثیر میزان اینوکلوم بر تولید بیوماس ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان تولید وزن تر و وزن خشک ریشه‌های مویین در مقدار اینوکلوم ۶ و ۹g l^{-1} تفاوت معنی‌داری با هم نداشته، ولی با میزان تولید بیوماس در مقدار اینوکلوم ۳g l^{-1} اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ داشته‌اند. مقادیر اینوکلوم ۶ و ۹g l^{-1} بیشترین مقدار وزن تر (به‌ترتیب ۱۶/۴ و ۱۴/۶۹g l^{-1}) و وزن خشک (به‌ترتیب ۲/۰۸۴ و ۱/۹۵g l^{-1}) را تولید کردند (جدول ۱).

جدول ۱– مقایسه میانگین وزن تر، وزن خشک و اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل کشت شده با سطوح مختلف اینوکلوم در بیوراکتور ستون حباب‌دار

مقدار اینوکلوم (g l^{-1})	وزن تر (g l^{-1})	وزن خشک (g l^{-1})	شاخص رشد	مقدار اسید شیکوریک (mg g^{-1} DW)
۳	۵/۹۳±۱/۴۳ b	۰/۶۴۱±۰/۱۱ b	۱/۱۳۷±۰/۰۴ b	۱۲/۹۲±۱/۵۳ b
۶	۱۶/۴±۰/۹۶ a	۲/۰۸۴±۰/۰۹ a	۲/۴۷۵±۰/۱۶ a	۱۶/۷۴±۲/۵۴ a
۹	۱۴/۶۹±۰/۲۹ a	۱/۹۵±۰/۰۶ a	۱/۱۶۷±۰/۰۶ b	۱۲/۴۲±۳/۱۲ b

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار براساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار است.

شکل ۲– ریشه‌های مویین تولید شده در بیوراکتور ستون حباب‌دار

Archive of SID

www.SID.ir

تأثیر میزان اینوکلوم بر شاخص رشد ریشه‌های مویین در بیوراکتور ستون حباب‌دار

در این آزمایش مقادیر مختلفی از ریشه‌های مویین (۳، ۶ و ۹g l^{-1}) به‌عنوان اینوکلوم استفاده شده‌است، از این‌رو ممکن است که اختلاف مشاهده شده در میزان تولید وزن تر و وزن خشک در سطوح مختلف اینوکلوم، ناشی از همین عامل (وزن اولیه متفاوت ریشه‌های مویین کشت شده) باشد؛ در نتیجه این دو صفت ممکن است نتوانند تأثیر واقعی مقدار اینوکلوم را بر رشد و نمو ریشه‌های مویین (تولید بیوماس) نشان دهند. بنابراین برای بررسی بهتر تأثیر مقدار اینوکلوم بر رشد ریشه‌های مویین، شاخص رشد محاسبه گردید که این شاخص، مقدار رشد واقعی را نشان می‌دهد. مقایسه میانگین شاخص‌های رشد در سطوح مختلف اینوکلوم نشان داد که شاخص رشد در مقدار اینوکلوم ۶g l^{-1} به‌طور معنی‌داری بیشتر از دو سطح دیگر بوده است (جدول ۱). در حقیقت استفاده از مقدار اینوکلوم ۶g l^{-1}، برای تولید بیوماس بیشتر در کشت ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل مناسب‌تر بود. تصویری از ریشه‌های مویین تولید شده در بیوراکتور ستون حباب‌دار در شکل ۲ دیده می‌شود.

تأثیر مقادیر مختلف اینوکلوم بر میزان تولید اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل

بیشترین میزان تولید اسید شیکوریک (۱۶/۷۴mg g^{-1} DW) در مقدار اینوکلوم ۶g l^{-1} بدست آمد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر سطوح اینوکلوم استفاده شده بود و مقدار اسید شیکوریک تولید شده در مقادیر اینوکلوم ۳ و ۹g l^{-1} اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۱).

تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید بیوماس در بیوراکتور ستون حباب‌دار

نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش سرعت هوادهی از ۰/۱ تا ۰/۴vvm، میزان تولید وزن تر و وزن خشک افزایش یافته و بیشترین مقدار تولید بیوماس ریشه‌های مویین (۱۵/۴g l^{-1} وزن تر و ۲/۴۶۷g l^{-1} وزن خشک) در سرعت هوادهی ۰/۴vvm و کمترین میزان تولید (۹/۱۶g l^{-1} وزن تر و ۱/۳۰۷g l^{-1} وزن خشک) در سرعت هوادهی ۰/۱vvm بدست آمده است. میزان تولید وزن تر و وزن خشک در دو سرعت هوادهی ۰/۲vvm و ۰/۴vvm اختلاف معنی‌دار آماری باهم نداشتند (جدول ۲).

جدول ۲- تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید وزن تر، وزن خشک و اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل

سرعت هوادهی (vvm)	وزن تر (g)	وزن خشک (g)	کاهش حجم محیط کشت (٪)	مقدار اسید شیکوریک (mg g^{-1} DW)
۰/۱	۹/۱۶±۰/۲۹ b	۱/۳۰۷±۰/۰۱۷ b	۲/۲۲±۲/۲ a	۱۱/۸۷±۰/۴۹ a
۰/۲	۱۴/۳۳±۱/۱۱ a	۱/۹۸±۰/۱۷ a	۸/۳±۱/۵ a	۱۲/۷۴±۰/۲۸ a
۰/۴	۱۵/۴۴±۱/۳۴a	۲/۴۶۷±۰/۴۶ a	۳۸/۳±۶/۷ b	۴/۵۶±۱/۰۴ b

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار براساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار است.

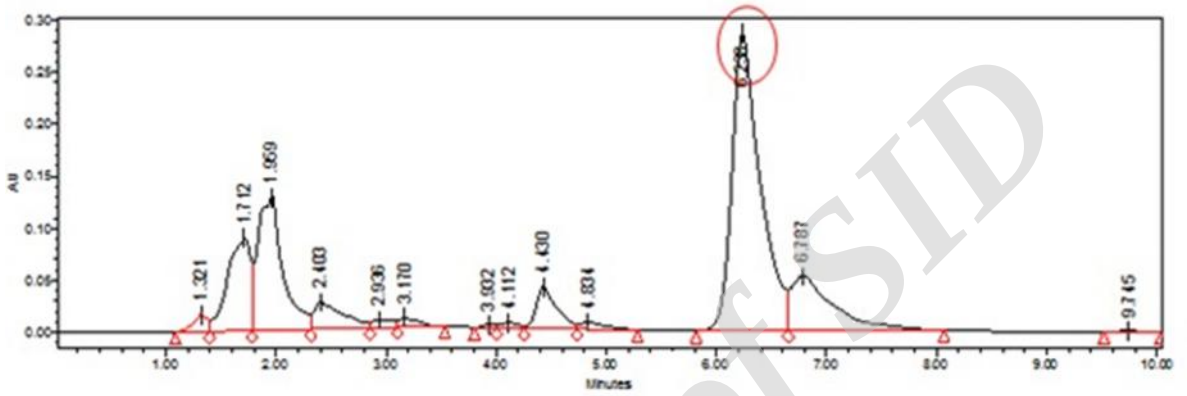
تأثیر سرعت هوادهی بر میزان کاهش حجم محیط کشت در انتهای دوره رشد ریشه‌های مویین

در این آزمایش حجم محیط کشت مایع داخل بیوراکتور در انتهای دوره رشد ریشه‌های مویین اندازه‌گیری شد و مشخص شد که میزان کاهش حجم محیط کشت در سرعت هوادهی ۰/۴vvm (۳۸/۳٪) نسبت به سرعت‌های هوادهی ۰/۲vvm (۸/۳٪) و ۰/۱vvm (۲/۲٪) بیشتر بوده‌است (جدول ۲).

Archive of SID
www.SID.ir

تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل

نتایج مطالعه اثر سرعت‌های مختلف هوادهی بر مقدار تولید اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین تولید شده در بیوراکتور ستون حباب‌دار نشان داد که مقدار تولید اسید شیکوریک در سرعت‌های هوادهی ۰/۱ و ۰/۲vvm (به‌ترتیب ۱۱/۸۷mg g^{-1} DW و ۱۲/۷۴mg g^{-1} DW) با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشته اما به‌طور معنی‌داری بیشتر از مقدار تولید آن در سرعت هوادهی ۰/۴vvm (۴/۵۶mg g^{-1} DW) بوده‌است (جدول ۲). در شکل ۳ کروماتوگرام HPLC اسید شیکوریک تولید شده در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل آورده شده‌است.



شکل ۳- کروماتوگرام HPLC اسید شیکوریک تولید شده در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل

بحث

تأثیر میزان اینوکلوم بر رشد ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل در بیوراکتور ستون حباب‌دار

یکی از فاکتورهای مؤثر در تولید بهینه بیوماس در کشت‌های درون شیشه‌ای مقدار اینوکلوم می‌باشد (Lee & Shuler, 2000؛ Huang *et al.*, 2004). در این مطالعه مشخص شد که مقدار اولیه ریشه‌های مویین کشت شده نقش مهمی در رشد و نمو بعدی آنها دارد و بیشترین میزان تولید بیوماس (وزن تر و وزن خشک به‌ترتیب ۱۶/۴g l^{-1} و ۲/۰۸۴۹g l^{-1}) و همچنین بیشترین مقدار شاخص رشد زمانی بدست آمد که در ابتدای کشت، مقدار ۶g l^{-1} از ریشه‌های مویین در بیوراکتور کشت شده بود. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که در مقدار اینوکلوم مناسب برای تولید بیوماس، مقدار اسید شیکوریک بیشتری نیز تولید می‌شود که با نتایج مطالعات انجام شده روی ریشه‌های نابجای گیاهان *Hypericum perforatum* و *Echinacea purpurea* مطابقت دارد (Jeong *et al.*, 2009؛ Cui *et al.*, 2010). در صورتی که مقدار اینوکلوم بیشتری کشت شود رشد نهایی ریشه‌های مویین کم می‌شود، زیرا در این شرایط، دسترسی به مواد مغذی و اکسیژن محدود بوده و ریشه‌ها زودتر به فاز ساکن (Stationary phase) رشد می‌رسند، در نتیجه میزان تولید تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در مطالعه‌ای مشخص شد که در مقدار اینوکلوم کم، ریشه‌های مویین در هر نوع بیوراکتور فاز مایع می‌توانند رشد بهتری داشته باشند اما در مقادیر بالاتر، رشد و نمو ریشه‌های مویین محدود می‌شود (Curtis, 2000). در بیوراکتورهای ستون حباب‌دار، به علت الگوی نامشخص جریان هوا، محیط کشت مایع اختلاط ناهمگنی دارد و ریشه‌های مویین کشت شده در این بیوراکتور در همدیگر پیچ خورده و تشکیل توده کروی شکل متراکم می‌دهند، در نتیجه رسیدن اکسیژن و محیط کشت مایع به داخل این توده محدود می‌شود، از این‌رو در کشت‌های با مقدار اینوکلوم بیشتر، بیوراکتورهای نوع ستون حباب‌دار با

Archive of SID

www.SID.ir

کاهش عملکرد مواجه هستند (Kwok & Doran, 1995). همچنین در کشت‌های با میزان بیوماس بالا، ممکن است که حباب‌های هوا به هم پیوسته و باعث کاهش سطح تماس گاز- مایع شوند (Huang & McDonald, 2012). به‌طور کلی، توسعه تکنیک‌ها و راهکارهای مناسب برای توزیع یکنواخت اینوکلوم ریشه‌ای، در مقیاس وسیع در داخل بیوراکتور، با مشکلات زیادی مواجه است (Ramakrishnan *et al.*, 1994).

تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید بیوماس در بیوراکتور ستون حباب‌دار

عواملی که روی انتقال مؤثر اکسیژن به ریشه‌های مویین در بیوراکتور مؤثر هستند، باید در طراحی بیوراکتور برای تولید متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی قرار گیرند (Chattopadhyay *et al.*, 2002). هوادهی مناسب یکی از عوامل مؤثر در کشت ریشه‌های مویین در بیوراکتورها است که در تأمین اکسیژن برای بافت گیاهی دخالت دارد. در بیوراکتورهای ستون حباب‌دار، علاوه بر تأمین اکسیژن مورد نیاز، اختلاط و همگنی محیط کشت مایع نیز توسط هوادهی انجام می‌شود. در نتیجه، در سرعت‌های هوادهی پایین، نه تنها اکسیژن کافی برای مصرف ریشه‌ها تأمین نمی‌شود بلکه اختلاط و همگنی محیط کشت مایع نیز به‌طور ضعیف انجام می‌گردد. بنابراین، میزان رشد در سرعت‌های هوادهی پایین کمتر خواهد بود (Choi *et al.*, 2006).

افزایش جریان هوا در بیوراکتور ستون حباب‌دار باعث افزایش اکسیژن محلول در محیط کشت شده که منجر به افزایش رشد ریشه‌های مویین می‌شود، اما افزایش بیشتر سرعت هوادهی، باعث افزایش تنش برشی (نیروی وارد بر سطح ریشه از طرف جریان مایع) نیز می‌شود. تنش برشی یکی از موانع کشت سلول و بافت گیاهی در مقیاس بالا محسوب می‌شود، زیرا به سلول و بافت گیاهی آسیب زده و باعث شکستن دیواره سلولی و در نتیجه تجمع بقایای سلولی می‌شود. تجمع بقایای سلولی و سلول‌های مرده منجر به ایجاد کف در بیوراکتور می‌شود که این امر باعث چسبیدن سلول‌ها و بقایای سلولی (Cell debris) به دیواره ظرف بیوراکتور شده و همچنین موجب تشکیل لایه‌ای در سطح ریشه‌های مویین شده که از رسیدن اکسیژن و مواد مغذی به ریشه‌ها جلوگیری کرده، در نتیجه شرایط کشت همگن را مختل می‌کند و در نهایت باعث کاهش تولید بیوماس می‌گردد و به همین دلیل توجه قابل ملاحظه‌ای را در تحقیقات به خود اختصاص داده‌است (Kino-Oka *et al.*, 1999؛ Yesil-Celiktas *et al.*, 2010). در این آزمایش نیز با افزایش سرعت هوادهی از ۰/۱ تا ۰/۲vvm، ابتدا میزان رشد ریشه‌های مویین بیشتر شد، اما بعد از آن، افزایش معنی‌داری در میزان رشد ریشه‌های مویین مشاهده نشد. علت عدم وجود تفاوت معنی‌دار در میزان تولید وزن تر و وزن خشک ریشه‌های مویین در سرعت هوادهی ۰/۴vvm نسبت به ۰/۲vvm، می‌تواند کاهش مقداری از محیط کشت مایع به علت خروج آن همراه با هوایی که از بیوراکتور خارج می‌شود، باشد. البته در سرعت هوادهی ۰/۴vvm، مقدار محیط کشت مایع داخل بیوراکتور نسبت به هوادهی ۰/۲vvm کاهش یافته بود. در واقع، در سرعت هوادهی ۰/۴vvm، به‌رغم وجود اکسیژن فراوان، کاهش حجم محیط کشت منجر به کاهش رشد و نمو ریشه‌های مویین شده بود. کاهش مقدار محیط کشت، از یک طرف باعث تغییر غلظت عناصر محیط کشت شده که ممکن است برای رشد ریشه‌های مویین مناسب نباشد (Murthy *et al.*, 2014) و از طرف دیگر، از آنجا که در بیوراکتورهای فاز مایع، ریشه‌ها به‌صورت غوطه‌ور در محیط کشت مایع هستند، از این‌رو با کاهش مقدار محیط کشت مایع، تراکم ریشه‌های مویین در واحد حجم محیط کشت مایع بیشتر شده، در نتیجه دسترسی ریشه‌ها به فضای کافی برای دریافت اکسیژن و مواد مغذی کاهش پیدا می‌کند. همچنین سرعت بالای هوادهی ممکن است منجر به خروج CO_2 و نیز برخی مواد فرّار از بیوراکتور گردد که ممکن است در رشد و نمو ریشه‌های مویین مؤثر باشند. CO_2 به‌عنوان یک عامل افزایش رشد ریشه‌ها از طریق کاهش فاز تأخیر شناخته شده‌است (Weathers *et al.*, 1999). همچنین، سرعت هوادهی بالا و

Archive of SID

www.SID.ir

در نتیجه اختلاط و گردش شدید محیط کشت مایع، منجر به آسیب برشی و شکستن دیواره سلولی و در نتیجه تجمع بقایای سلولی می‌شود. تجمع بقایای سلولی و سلول‌های مرده منجر به ایجاد کف در بیوراکتور می‌شود که این امر باعث چسبیدن این مواد در دیواره ظرف کشت شده و از طرف دیگر باعث تشکیل لایه‌ای در سطح ریشه‌های مویین شده که می‌تواند از رسیدن اکسیژن و مواد مغذی به ریشه‌ها جلوگیری کرده، در نتیجه شرایط کشت همگن را مختل کند (Yesil Celiktas *et al*., 2010).

تأثیر سرعت هوادهی بر میزان کاهش محیط کشت مایع

سرعت نسبتاً بالای هوادهی به مرور زمان باعث خروج رطوبت داخل بیوراکتور می‌شود. در حقیقت، هوای ورودی به داخل بیوراکتور میزان رطوبت پایینی داشته، ولی هوای خروجی به علت عبور از محیط کشت مایع، مقداری از رطوبت محیط کشت مایع داخل بیوراکتور را جذب کرده، در نتیجه مقدار رطوبت بالایی دارد و این عامل باعث کاهش حجم محیط کشت مایع در سرعت‌های هوادهی بالا شده‌است.

تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید اسید شیکوریک

مطالعات انجام شده روی تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه نشان داده‌است که میزان تولید متابولیت با افزایش سرعت هوادهی کاهش می‌یابد، به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای روی ریشه‌های نابجای گیاه سرخارگل مشخص شده‌است که میزان تولید اسید شیکوریک، با افزایش سرعت هوادهی از ۰/۱vvm تا ۰/۳vvm کاهش می‌یابد (Jeong *et al*., 2009). نتایج این آزمایش نشان داد که رابطه مستقیمی بین میزان تولید اسید شیکوریک و محیط کشت باقیمانده در بیوراکتور وجود دارد، به‌طوری که با کاهش حجم محیط کشت مایع در سرعت‌های بالای هوادهی، میزان تولید اسید شیکوریک به‌شدت کاهش یافت. با توجه به مطالب فوق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تولید کمتر اسید شیکوریک در سرعت‌های بالای هوادهی می‌تواند ناشی از عواملی مانند تنش‌های مکانیکی وارد شده به ریشه‌های مویین، کاهش حجم محیط کشت و در نتیجه تغییر غلظت ترکیب‌های محیط کشت و نیز خروج گازها و مواد فرّار تولید شده توسط ریشه‌های مویین باشد که در تولید متابولیت‌های ثانویه مؤثرند (Weathers *et al*., 1999).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت، کشت در بیوراکتور مرحله اساسی برای تولید ریشه‌های مویین در حجم زیاد می‌باشد. بهینه کردن شرایط تولید ریشه‌های مویین برای افزایش بیوماس و مقدار مواد مؤثره در بیوراکتور امری ضروریست. میزان اینوکلوم اولیه و سرعت هوادهی از مهمترین عواملی هستند که در توسعه بیوراکتور برای کشت ریشه‌های مویین باید مورد توجه قرار گیرند. در این پژوهش مشخص شد که مقدار اینوکلوم $6\ g\ l^{-1}$ و سرعت هوادهی ۰/۲vvm برای تولید بیوماس و اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل در بیوراکتور ستون حباب‌دار مناسب هستند و می‌توان از یافته‌های این پژوهش، برای تولید بیوماس مناسب و اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل در بیوراکتور ستون حباب‌دار ساخته شده در این پژوهش استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

- Abbasi, B.H., Liu, R., Saxena, P. and Liu, C.Z., 2009. Cichoric acid production from hairy root cultures of *Echinacea purpurea* grown in a modified airlift bioreactor. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 84(11): 1697-1701.
- Abbasi, B.H., Stiles, A.R., Saxena, P.K. and Liu, C.Z., 2012. Gibberellic acid increases secondary metabolite production in *Echinacea purpurea* hairy roots. Applied Biochemistry and Biotechnology, 168(7): 2057-2066.
- Abbasi, B.H., Tian, C.L., Murch, S.J., Saxena, P.K. and Liu, C.Z., 2007. Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. Plant Cell Reports, 26(8): 1367-1372.
- Abdoli, M., 2013. Study on Cichoric acid production via optimization of hairy roots culture and polyploidy induction in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Ph.D thesis, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Facultuy of

Archive of SID
www.SID.ir

30(2): 398-409.
- Jeong, J.A., Wu, C.H., Murthy, H.N., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2009. Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14: 91-98.
- Kayser, O. and Quax, W.J., 2007. Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications. Weinheim, Wiley-VCH Press, 576p.
- Kino-Oka, M., Hitaka, Y., Taya, M. and Tone, S., 1999. High-density culture of red beet hairy roots by considering medium flow condition in a bioreactor. Chemical Engineering Science, 54(15-16): 3179-3186.
- Kittipongpatana, N., Hock, R.S. and Porter, J.R., 1998. Production of solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52: 133-143.
- Kwok, K.H. and Doran, P.M., 1995. Kinetic and stoichiometric analysis of hairy roots in a segmented bubble column reactor. Biotechnology Progress, 11(4): 429-435.
- Lee, C.W. and Shuler, M.L., 2000. The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. Biotechnology and Bioengineering, 67: 61-71.
- Lee, J. and Scagel, C.F., 2013. Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. Frontiers in Chemistry, 1: 1-17.
- Liu, C.Z., Wang, Y., Zhao, B., Guo, C., Ouyang, F., Ye, H. and Li, G., 1999. Development of a nutrient mist bioreactor for growth of hairy roots. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology Plant, 35: 271-274.
- Liu, R., Li, W., Sun, L. and Liu, C., 2012. Improving root growth and cichoric acid derivatives production in hairy root culture of *Echinacea purpurea* by ultrasound treatment. Biochemical Engineering Journal, 60: 62-66.
- Liu. C.Z., Abbasi, B.H., Gao, M., Murch, S.J. and Saxena, P.K., 2006. Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(22): 8456-8460.
- Min, J.Y., Jung, H.Y., Kang, S.M., Kim, Y.D., Kang, Y.M., Park, D.J., Prasad, D.T. and Choi, M.S., 2007. Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots. Bioresource Technology, 98: 1748-1753.
- Murthy, H.N., Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2014. Agriculture, Tarbiat Modares University, Iran.
- Abdoli, M., Moieni A. and Naghdi Badi, H., 2013. Influence of KNO_3, $CaCl_2$ and $MgSO_4$ concentrations on growth and cichoric acid accumulation in hairy root culture of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Journal of Medicinal Plants, 45: 75-84.
- Bakkali, A.T., Jaziri, M., Foriers, A., Vander Heyden, Y., Vanhaelen, M. and Homes, J. 1997. Lawsone accumulation in normal and transformed cultures of henna, *Lawsonia inermis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51(2): 83-87.
- Banerjee, S., Rahman, L., Uniyal, G.C. and Ahuja, P.S., 1998. Enhanced production of valepotriates by Agrobacterium rhizogenes induced hairy root cultures of *Valeriana wallichii* DC. Plant Science, 131(2): 203-208.
- Baque, M.A., Moh, S.H., Lee, E.J., Zhong, J.J. and Paek, K.Y. 2012. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. Biotechnology Advances, 30(6): 1255-1267.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161(5): 839-851.
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A.K. and Bisaria, V.S., 2002. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 7: 138-149.
- Choi, Y.E., Kim, Y.S. and Paek, K.Y., 2006. Types and designs of bioreactors for hairy root culture. Plant Tissue Culture Engineering, 6: 161-172.
- Cui, X.H., Chakrabarty, D., Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2010. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. Bioresource Technology, 101(12): 4708-4716.
- Curtis, W.R., 2000. Hairy roots, bioreactor growth: 827-841. Spier, R.E., (Ed.). Encyclopedia of Cell Technology. Wiley-Interscience, 1249p.
- Eibl, R. and Eibl, D., 2008. Design and use of the wave bioreactor for plant cell culture. Plant Tissue Culture Engineering, 6: 203-227.
- Huang, S.Y., Hung, C.H. and Chou, S.N., 2004. Innovative strategies for operation of mist trickling reactors for enhanced hairy root proliferation and secondary metabolite productivity. Enzyme and Microbial Technology, 35: 22-32.
- Huang, T.K. and McDonald, K.A., 2012. Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures. Biotechnology Advances,

Archive of SID
www.SID.ir

acid is an antioxidant molecule that stimulates AMP Kinase pathway in L6 Myotubes and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Plos One, 8: 78-88.
- Sivakumar, G., 2006. Bioreactor technology: A novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. Biotechnology Journal, 1: 1419-1427.
- Wang, B., Zhang, G., Zhu, L., Chen, L. and Zhang, Y., 2006. Genetic transformation of Echinacea purpurea with Agrobacterium rhizogenes and bioactive ingredient analysis in transformed cultures. Colloids and Surfaces Biointerfaces, 53: 101-104.
- Weathers, P., Wyslouzil, B., Wobbe, K., Kim, Y. and Yigit, E., 1999. The biological response of hairy roots to O_2 levels in bioreactors. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 35: 286-289.
- Yesil Celiktas, O., Gurel, A. and Vardar-Sukan, F., 2010. Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. Transworld Research Network, 1-54.

Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC): 1-16.
- Paek, K., Chakrabarty, D. and Hahn, E., 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81(3): 287-300.
- Ramakrishnan, D., Salim, J. and Curtis, W.R., 1994. Inoculation and tissue distribution in pilot-scale plant root culture bioreactors. Biotechnology Techniques, 8(9): 639-644.
- Romero, F.R., Delate, K., Kraus, G.A., Solco, A.K., Murphy, P.A. and Hannapel, D.J., 2009. Alkamide production from hairy root cultures of *Echinacea*. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 45: 599-609.
- Schlernitzauer, A., Oiry, C., Hamad, R., Galas, S., Cortade, F., Chabi, B., Casas, F., Pessemesse, L., Fouret, G. and Feillet-Coudraym, C., 2013. Chicoric

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of inoculum density and aeration rate on biomass and cichoric acid production in *Echinacea purpurea* L. hairy roots in bubble column bioreactor

F. Ahmadi[1], A. Moieni[2*] and S. Rashidi Monfared[3]

1- MSc., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, E-mail: moieni_a@modares.ac.ir
3- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: January 2015 Revised: May 2015 Accepted: June 2015

Abstract

In this research, *Echinacea purpurea* L. hairy roots were cultured in 1000 ml bubble column bioreactor containing 500 ml WPM liquid medium and the effects of inoculum densities (3, 6 and 9g l^{-1}) and aeration rates (0.1, 0.2 and 0.4vvm) on biomass and cichoric acid production were investigated. Fresh and dry weights and also the cichoric acid content in hairy roots were measured after 30 days. The results showed that the highest amount of biomass (16.4g l^{-1} fresh weight and 2.084g l^{-1} dry weight) and cichoric acid (16.74mg g^{-1} DW) were produced in the inoculum density of 6 g l^{-1}. The investigation of aeration rates on biomass and cichoric acid production showed that the maximum fresh weight (15.4g l^{-1}) and dry weight (2.467g l^{-1}) were obtained in aeration rate of 0.4vvm and the maximum cichoric acid content (12.74mg g^{-1} DW) was obtained in aeration rate of 0.2vvm. Overall, the inoculum density and aeration rate had considerable effects on the hairy root growth and development in bubble column bioreactor and they should be optimized for obtaining the highest hairy root biomass and secondary metabolites.

Keywords: *Echinacea purpurea* L., secondary metabolite, medicinal plant, *in vito* culture.

Archive of SID

www.SID.ir