ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۴۰۲- ۳۹۱

تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه در گیاهان با بکارگیری راهکارهای زیست فناوری

Biotechnology for large scale production of plants secondary metabolites

منصور امیدی*[۱]، پریسا عبداللهی[۲]

۱- استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،کرج، ایران
۲- دکتری ژنتیک مولکولی ، مرکز تحقیقات RIKEN، یوکوهاما، ژاپن

Omidi M*[1], Abdollahi P[2]

1. Professor, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Graduated PhD Student, RIKEN Institute, Yokohama, Japan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: momidi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت:۹۳/۶/۱۲ - تاریخ پذیرش:۹۳/۹/۱۸)

چکیده

گیاهان متابولیت‌های ثانویه با ارزش اقتصادی بالا و با کاربردهای متفاوتی مانند داروها، طعم دهنده‌ها، خوشبوکننده‌ها، رنگدانه‌ها، حشره‌کش‌ها و غیره تولید می‌کنند. تولید این ترکیبات همواره تحت‌تاثیر عوامل مختلف چون سطح پایین تولید، غیر یکنواختی کیفیت و تامین مواد اولیه مواجه می‌شود. تقاضای رو به رشد بازار امروز برای محصولات طبیعی و قابل تجدید سبب شده که کشت مواد گیاهی در شرایط درون‌شیشه به عنوان یک روش جایگزین برای تولید محصولات شیمیایی آنها مدنظر قرار گیرد. کشت سلولی و کشت بافت نمونه‌های گیاهی تحت شرایط استریل عموما به دو منظور تکثیر گیاه مورد نظر و استخراج متابولیت ثانویه انجام می‌شود اما معمولا اکثر روش‌های کشت سلولی گیاهی برای تولید یک ماده مورد نظر با شکست مواجه شده و ارائه راهبردهای نوین جهت بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه باید مد نظر قرار گیرد. الیسیتورها ترکیباتی زیستی و یا غیر زیستی هستند که به شروع ساخت متابولیت‌های ثانویه کمک می‌کنند. هورمون‌های گیاهی مانند متیل جاسمونت و اسید جیبرلیک، پلی‌ساکاریدهایی چون کیتوزان از جمله الیسیتورهای زیستی می‌باشند. لیزرکم توان هلیم- نئون و فراصوت نیز مثال‌هایی در زمینه الیسیتورهای غیرزیستی می‌باشد. عدم وجود اطلاعات کافی در مورد مسیرهای ساخت بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه و مکانیسم‌های مربوط به تولید این ترکیبات بزرگترین مانع بر سر راه تولید این ترکیبات است. زمانی که تولید متابولیت مورد نظر به دلیل فقدان یک پیش‌ساز خاص با محدودیت مواجه می‌شود، روش‌هایی همچون دستکاری ژنتیکی، مهندسی متابولیک و نیز تبدیل زیستی یک پیش‌ساز (مانند اسیدهای آمینه) که به محیط کشت اضافه می‌شود، می‌تواند به افزاش تولید و تجمع ترکیب مورد نظر کمک کند. تلقیح ریشه‌های مویین با آگروباکتریوم و تولید ریشه‌های تراریخته از دیگر روش‌هایی است که با انتقال ژن‌های دلخواه به کمک آگروباکتریوم به ریشه مویین، تولید متابولیت‌های ثانویه را بهبود می‌بخشند. بی‌حرکت کردن سلول‌ها که عموما با استفاده از آلژینات کلسیم انجام می‌شود به موازات استفاده از بیورآکتورهای مناسب می‌تواند به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه کمک کند. در این مقاله راهکارهای مفید جهت بهینه سازی تولید متابولیت‌های ثانویه در سطح انبوه با کمک روش‌های نوین زیست فناوری بررسی شده است.

واژه‌های کلیدی

الیسیتور
بیورآکتور
تولید انبوه
کشت سلولی
مهندسی متابولیک

Archive of SID

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه ترکیبات آلی هستند که برخلاف متابولیت‌های اولیه به شکل مستقیم در رشد، نمو و تولید مثل یک موجود زنده دخیل نیستند. فقدان متابولیت‌های ثانویه باعث مرگ فوری موجود نمی‌شود بلکه در طولانی مدت می‌تواند سبب اختلال در بقا، باروری و یا تغییرات ظاهری شده و گاهی نیز تغییری ایجاد نمی‌کند. متابولیت‌های ثانویه گیاهان از آغاز زندگی بشر برای درمان عفونت‌ها و بیماری‌ها استفاده شده‌اند. طی صد سال گذشته داروهای شیمیایی ساختگی جایگزین ترکیبات طبیعی شده‌اند که برای ساختن داروهای شیمیایی همچون آسپرین و سالیسیلیک اسید نیز از ساختار گیاهان الگوبرداری شده است (Wyke and Wink 2004). متابولیت‌های ثانویه دارویی شامل آلکالویید، گلیکوزید، فلاونویید، روغن‌های ولاتیل، تانن‌ها، رزین ها و ... امروزه از گیاهان وحشی و یا زراعی استخراج می‌شوند. به دلیل اینکه ساخت این ترکیبات با ارزش با روش‌های شیمیایی مقرون به صرفه نیست، تولید آنها از طریق بکارگیری روش‌های زیست فناوری و کشت سلولی گیاهی به عنوان یک روش جایگزین مدنظر قرار گرفته است که نقش مهمی در ایجاد روش-های جایگزین برای تولید ترکیبات دارویی گیاهی مورد نیاز دارد (Rao and Ravishankar 2002). تقاضای رو به رشد بازار امروز برای محصولات طبیعی قابل تجدید، باعث شده که کشت مواد گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد توجه قرار گیرد و با در نظر گرفتن گیاهان به عنوان کارخانه بالقوه تولید کننده محصولات بیوشیمیایی، زمینه تحقیقاتی جدیدی برای تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون‌شیشه‌ای ایجاد شود (Philipso 1990). متابولیت‌های ثانویه تولید شده از گیاه کاربردهای گسترده‌ای در زمینه تجاری و صنعتی دارند که از جمله آنها طعم دهنده‌ها، خوشبوکننده‌ها، سوخت‌های زیستی، پلاستیک، آنزیم‌ها، مواد آرایشی و رنگدانه‌های طبیعی هستند. در بسیاری موارد کشت‌های درون شیشه‌ای در شرایط کاملا کنترل شده و بطور دقیق می‌توانند همان ترکیبات با ارزش گیاهان را تولید کنند (Karuppusamy 2009). تولید درون‌شیشه‌ای متابولیت‌های ثانویه به روش کشت سلولی گیاهی مزایایی نسبت به تولید آن در درون گیاه دارد. تولید این ترکیبات قابل پیش‌بینی، اطمینان‌بخش و ساده است؛ جداسازی ترکیب بیوشیمیایی از کشت سلولی نسبت به استخراج از کل گیاه سریع‌تر و با کارایی بالاتری انجام می‌شود؛ در تمام طول سال در همه فصول و با هر شرایط آب و هوایی و بدون محدودیت جغرافیایی قابل تولید هستند؛ عوامل مداخله‌گر[1] که در شرایط کشت در مزرعه مشکل آفرین‌اند در کشت درون‌شیشه قابل اجتناب هستند؛ کشت سلولی و کشت اندام‌ها می‌تواند ترکیبات بیوشیمیایی را در حجم بالا و با عملکرد بالا تولید کند؛ کشت سلول‌ها می‌تواند برای مطالعه الیسیته شدن استفاده شود و از آنجا که امکان نشاندار کردن آنها با مواد رادیواکتیو وجود دارد می‌توان مسیرهای متابولیسمی را ردیابی کرد (Karuppusamy 2009).

در کشت سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه ترکیبات محیط کشت، ریزنمونه، شرایط فیزیکی، افزودن پیش‌سازها، استفاده از القاگرهای زنده و غیر زنده، افزایش نفوذپذیری سلول، دور کردن محصول از محل تولید، بی‌تحرک کردن سلول‌های گیاهی و انتخاب سلول‌هایی با کارآیی بالا، از مهمترین عوامل موثر در افزایش تولید متابولیت ثانویه در کشت سلولی می‌باشند. از طرفی مهندسی ژنتیک گیاهی نقش چشمگیری در زمینه شناسایی و دستکاری ژنتیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیکی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه داشته است. انتقال ژن ابزاری قوی جهت افزایش بازدهی و تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای داشته که محدودیت بازدهی دارند (Omidi and Farzin 2012).

این مقاله به بررسی راهکارهای مختلف زیست فناوری و توانمندی آنها جهت تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه در کشت درون‌شیشه‌ای و در سطح انبوه پرداخته است.

کشت بافت و کشت سلولی در تولید متابولیت‌های ثانویه

روش رایج تولید متابولیت‌های ثانویه در سطح تجاری استخراج از کل گیاه است. در کنار این روش قدیمی، کشت سلول گیاهی و کشت بافت در مقیاس بالا یک روش جایگزین قابل توجه می باشد که با کمک بیورآکتورها امکان‌پذیر است. بیورآکتورها محیط استریلی را که عوامل محیطی آن از قبیل دما، تنفس، میزان اکسیژن، میزان حرکت و pH قابل کنترل است، فراهم می‌کنند و به کارگیری آنها روش مطمئنی برای تکثیر گیاهان صنعتی می‌باشد (Paek et al. 2005). بر اساس تولید نهایی سه نوع سیستم کشت

[1] Interfering compound

Archive of SID
www.SID.ir

در بیورآکتورها وجود دارد. گروهی که تولید نهایی آنها سلول، اندام‌های رویشی و زایشی، ساقه، ریشه و به طور کلی تولید بیومس می‌باشد. گروه دیگر که تولید نهایی آنها متابولیت‌ها و آنزیم‌ها می‌باشد و نهایتا گروهی که برای تبدیل زیستی[1] پیش-سازهای مسیرهای متابولیکی به متابولیت‌های ثانویه به کار گرفته می‌شوند (Paek et al. 2005). بیورآکتورها برای کشت بافت‌های گوناگون گیاهان در مقیاس بالا مناسب هستند و اولین بار برای تولید بگونیا از بیورآکتورها استفاده شد (Takayama and Misawa 1981). از موارد استفاده کشت سلول‌های گیاهی تولید محصولاتی با مصارفی از قبیل دارویی، خوشبوکننده‌ها، طعم دهنده‌ها و مواد شیمیایی با خلوص بالا[2] می‌باشد که مشکلاتی از قبیل رشد کند، ناپایداری ژنتیکی، ناتوانی در نگهداری رشد فتواتوتروفیک، عدم پایداری لاین‌های سلولی تولید کننده[3]، و دانش محدود در مورد مسیرهای متابولیکی تکثیر گیاهان از طریق کشت سلولی را محدود می‌کند (Fulzele 2005; Paek et al. 2005). در زمان طراحی و انتخاب بیورآکتورها مسائلی از قبیل حساسیت سلول‌ها به برش، سرعت چرخش و شناور شدن آنها باید مدنظر قرار گیرند. اکسیژن رسانی نامناسب و یا روش مخلوط کردن و بهم زدن محیط کشت نیز دیگر مواردی هستند که احتمالا برای کشت‌های سوسپانسیونی با غلظت بالا مطلوب نباشند (Paek et al. 2005). سلول‌های تمایز نیافته ریشه‌های مویین جهت کشت سلولی مورد توجه ویژه‌ای می‌باشند که با استقرار در محیط کشت مایع قادرند به رشد خود به میزان بالایی ادامه دهند و با وجود ظرافت و شکنندگی آنها بیورآکتورهای متعددی قادر به کشت آنها هستند (Giri and Narasu 2000). مشکل اصلی در کشت ریشه‌های مویین مساله اکسیژن رسانی به بخش‌های میان بافتی است که در صورت فقدان اکسیژن به یک توده بافت پیر تبدیل می‌شوند. کارایی ریشه‌های مویین به عنوان یک منبع کشت بافت بستگی به پیشرفته بودن بیورآکتورها و اینکه چه میزان پارامترهای فیزیکی و شیمیایی را تحت کنترل داشته باشند، دارد (Paek et al. 2005) سلول‌های سوماتیکی نیز یک منبع بالقوه برای تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه در بیورآکتورها هستند و به جهت اینکه اندازه کوچک و یکنواخت دارند و جهت کشت نیازی به برش ندارند نسبت به روش‌های سنتی ریز ازدیادی ارجحیت دارند. علاوه بر آن سلول‌های سوماتیک جنینی تحت شرایط سرما[4] و خشک شدن[5] ماندگارترند و همین ویژگی باعث می‌شود انتقال و تکثیر آنها آسان‌تر باشد (Paek et al. 2005). بزرگترین محدودیت تولید درون شیشه افزایش تولید در سطح انبوه به منظور تجاری کردن محصول است. ریشه‌های مویین، کالوس و کشت‌های سوسپانسیونی همگی در زمان انبوه‌سازی با مشکلاتی مواجه می‌شوند. تولید متابولیت‌های ثانویه در سطح انبوه به روش کشت بافت اولین بار توسط Tuleck and Nickell (1959) انجام شد. از بین صدها متابولیت ثانویه که به وسیله کشت سلول‌های تمایز نیافته در سطح انبوه تولید شدند تنها شیکونین[6]، جینسنوساید[7] و بربرین[8] در حجم بالا تولید شده‌اند و در واقع موفق‌ترین نمونه‌های تولید شده در سطح تجاری بوده‌اند (Bourgard et al. 2011). در کشورهای چین، ژاپن و کره از گیاه جینسنگ به عنوان داروی التیام بخش استفاده می‌شود (Tang and Eisenbrand 1992) که امروزه به شکل کپسول، صابون، نوشیدنی و مواد آرایشی به بازار عرضه می‌شود. گیاه جینسنگ محتوی ساپونین[9]، آنتی اکسیدان، پپتید، پلی ساکارید، اسیدهای چرب، الکل و ویتامین است (Huang 1993). ساپونین که تحت عنوان جینسنوساید شناخته می‌شود ماده موثر و فعال جینسنگ می‌باشد. از آنجا که کشت جینسنگ در مزرعه نیازمند زمان و نیروی انسانی زیادی است کشت بافت و کشت سلولی به عنوان یک روش جایگزین برای تولید بیشتر آن استفاده می‌شود. کشت بافت جینسنگ اولین بار در سال ۱۹۶۴ (Luo et al. 1964) انجام شد. کشت سوسپانسیون جینسنگ در سطح انبوه اولین بار در ژاپن انجام شد (Yasuda et al. 1972) و تولید انبوه و صنعتی جینسنگ در دهه ۱۹۸۰ در شرکت Nitto Denko Corporation در اساکا و ایباراکی ژاپن با استفاده از بیورآکتورهای STR[10] آغاز شد

[1] Biotransformatiom
[2] Fine chemicals
[3] Productive cells

[4] Cryopreservation
[5] Desiccation
[6] Shikonin
[7] Ginsenoside
[8] Berberine
[9] Saponin
[10] Stirred tank bioreactor

Archive of SID
www.SID.ir

(Furuya et al. 1984). کشت سلولی جینسنگ به دلیل روند کند رشد و میزان بالای آب مورد نیاز هنوز به سطح تولید تجاری نرسیده است. روش کشت ریشه‌های مویین نسبت به کشت سلولی روش مناسب‌تری است که مشکلات مذکور را ندارد (Yoshikawa and Furuya 1978; Yu et al. 2000) اما ریشه‌های مویین ماده اوپین مانندی تولید می‌کنند که برای سلول‌های پستانداران کشنده است و به منظور جلوگیری از بروز این مشکل از کشت ریشه‌های آغازین[1] استفاده می‌کنند (Paek et al. 2005) که هم روند رشد سریعتری دارند و هم متابولیت ثانویه را در سطح پایدار و با عملکرد بالاتری تولید می‌کنند. جینسنگ سیبری یکی از گونه‌های در معرض خطر نابودی است که تکثیر آن به روش سنتی به دلیل اینکه نیاز به زمان طولانی برای آغاز جوانه زدن[2] و بلوغ تخم جنینی دارد کار مشکلی است (Isoda and Shoji 1994). تکثیر این نوع جینسنگ از طریق کشت سلولی سوماتیک جنینی (Gui et al. 1991; Choi et al. 1999a)، کشت کالوس جنینی و کشت سوسپانسیون سلولی (Choi et al. 1999b) انجام شده اما تولید انبوه این گونه گیاهی در بیوراکتورهای BTBB[3] از طریق کشت سلول‌های سوماتیک جنینی Paek et al. (2011) و همچنین کشت در بیوراکتورهای air-lift (Kim and Kim 2001) امکان‌پذیر شد.

نقش پیش‌سازها و الیسیتورها به منظور بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه

پیش‌سازها شامل ترکیبات زیستی مختلفی هستند که در ابتدا و یا میانه مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه وجود دارند و افزودن آنها به محیط کشت می‌تواند میزان تولید محصول نهایی مورد نظر را افزایش دهد (Rao and Ravishankar 2002). اسیدهای آمینه از جمله ترکیباتی هستند که به عنوان پیش‌سازها در محیط‌های کشت به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه به کار می روند. به عنوان مثال دو متابولیت ایزوفلاون[4] و فلانویید[5] از اسید آمینه فنیل‌آلانین مشتق می‌شوند که در بالادست مسیر متابولیکی فنیل پروپانویید[6] قرار دارد. افزودن فنیل‌آلانین به محیط کشت میزان تولید متابولیت‌های مورد نظر را افزایش می‌دهد (Shinde et al. 2009). نقش اسیدهای آمینه در ساخت هایپرفورین[7] و آدهایپرفورین[8] در کشت ساقه *Hypericum perforatum* نیز گزارش شده است. اسید آمینه‌های والین و ایزولوسین به ترتیب در کشت ساقه به زنجیره آسیلی هایپرفورین و آدهایپرفورین متصل می‌شوند. افزودن ال-ایزولوسین با غلظت دو میلی‌مولار باعث القای تولید آدهایپرفورین به میزان سه تا هفت برابر بیشتر می‌شود و افزودن سه میلی‌مولار ترونین[9]، پیش‌ساز ایزولوسین، تولید و تجمع آدهایپرفورین را دو برابر افزایش می‌دهد (Karppinen et al. 2007). تاثیر وجود اسید آمینه‌ها در افزایش تولید تری‌ترپن‌ها در کالوس‌های مشتق شده از برگ و کشت سوسپانسیون سلولی *Centella asiatica* نیز گزارش شده است (Kiong et al. 2005). از آنجا که اسید آمینه ال- آرژنین در ریشه-زایی نقش موثری دارد (Tabatabaei and Omidi 2012) از آن در بهبود محیط کشت و القای ریشه مویین گیاه روناس (*Rubina tinctorum* L.) استفاده می‌شود (Ghorbani 2014).

تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاه بخشی از واکنش دفاعی گیاه در برابر حمله پاتوژن‌هاست که بوسیله الیسیتورها که ترکیبات سیگنالی مربوط به واکنش‌های دفاعی گیاهان هستند آغاز و فعال می‌شود (Zhao et al. 2005). در شرایط درون‌شیشه‌ای گیاهان و سلول‌های گیاهی به عوامل شیمیایی، فیزیکی و میکروبی تحت عنوان الیسیتورها، واکنش‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی نشان می‌دهند. الیسیته کردن روندی است که باعث افزایش ساخت متابولیت‌های ثانویه گیاهان شده و بقا، تداوم و رقابت‌پذیری آنها را تضمین می‌کند (Namdeo 2007). بنابراین استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی در تیمارهای کشت سلولی روش مفیدی برای افزایش سطح تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی است. رایج‌ترین الیسیتورهای مورد استفاده در تحقیقات گذشته کربوهیدرات‌های قارچی، عصاره مخمر، متیل

[1] Adventitious root
[2] Startification
[3] Balloon type bubble bioreactor
[4] Isoflavone
[5] Flavonoids
[6] Phenylpropanoid
[7] Hyperforin
[8] Adhyperforin
[9] Theronine

Archive of SID
www.SID.ir

جاسمونیت (MJ) و کیتوزان[1] می‌باشد. متیل جاسمونیت یک ترکیب سیگنالی بوده که به عنوان موثرترین الیسیتور در تولید تاکسول از گیاه *Taxus chinesis Roxb*. (Yukimune et al. 1996) و تولید جینسنوساید از گیاه *Panax ginseng C.A. Meyer* با استفاده از کشت سلولی و کشت اندام‌ها گزارش شده است (Kim et al. 2008). طی مطالعاتی در جینسنگ اثر چند الیسیتور غیرزیستی برای افزایش رشد و بیوسنتز ساپونین در ریشه‌های مویین *Panax ginseng* بررسی شده که نشان داد تیمار کردن گیاه با الیستورها اگرچه از رشد ریشه‌های مویین ممانعت می‌کند ولی باعث افزایش بیوسنتز ساپونین در جینسنگ می‌شود (Jeong and Park 2007). در تحقیقی تاثیر الیسیتوری چهار هورمون جیبرلیک اسید (GA3)، سیتوکنین (iP2)، متیل جاسمونات (MeJA) و سالیسیلیک اسید (SA) بر روی تولید آرتمیزینین در گیاه *Artemisia annua* در زمان‌های مختلف پس از اعمال تیمار مورد بررسی قرار گرفته است . مشاهده شده که MeJA بیشترین تاثیر را بر روی افزایش تولید آرتمیزینین در مقایسه با سه هورمون دیگر داشته است. iP2 و SA در رتبه بعد وGA3 کمترین تاثیر را نسبت به سایرین داشته است. بنابراین هورمون MeJA به دلیل تحریک بیشتر و نیز تاثیر افزایشی یکنواخت بر تولید آرتمیزینین در زمان‌های مطالعه شده، الیسیتور بهتری شناسایی شد (Zare mehrjardi et al. 2012).

کروسین[2] رنگ کننده با ارزشی است که هم ارزش غذایی داشته و و هم در بهداشت و سلامت مفید است. محلول بودن آن در آب یک ویژگی منحصر به فرد در بین رنگدانه‌های آپوکارتنوییدی است. از منابع تولید کننده کروسین گل زعفران و همچنین گل بالغ گاردنیا *Gardenia jasminoides* Ellis است که به دلیل گران‌قیمت بودن این منابع و همچنین فصلی بودن آنها امکان دسترسی به آنها محدود می‌باشد. بنابراین روش‌های زیست فناوری برای تولید این رنگدانه‌ها به عنوان یک روش جایگزین مد نظر قرار گرفته که روش‌های درون‌شیشه‌ای از جمله القای استیگما[3] از انواع آن است. گزارشات نشان داده که اگرچه القای کالوس از تخمدان گاردنیا و بافت میوه کار نسبتا ساده‌ای است اما میزان کروسین تولید شده به روش القای استیگما در مقایسه با تولید آن به شکل طبیعی پایین‌تر بوده و ثابت نگهداشتن میزان کروسین مشکل عمده تولید آن است. برای اولین بار کروسین و مشتقات ساختگی آن در ساختارهای استیگما مانند به میزان قابل توجهی نسبت به شکل طبیعی آن تولید شدند Andrey et al. (2006). در محیط کشتی که برای رشد تخمدان‌های سبز انتخاب شده از گیاه گاردنیا تهیه شده بودند سری‌های مختلفی از الیسیتورها با غلظت‌های متفاوت استفاده شد و تاثیر آنها روی رشد کالوس و میزان تولید کروسین مورد بررسی قرار گرفت. این الیسیتورها شامل غلظت‌های مختلف متیل جاسمونیت، ذغال چوب فعال شده[4]، اینوزیتول، گلوکز، اسید اسکوربیک، اسید سیتریک، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز(CAT) بودند (Andrey et al. 2000). از آنجا که نانوذرات قادر به تحریک مکانیسم دفاعی در سلول و تولید متابولیت‌های ثانویه هستند اخیرا از آنها در محیط‌های کشت به عنوان الیسیتور استفاده شده‌است (Raei et al. 2012; Khodayari et al. 2013; Bondarian et al. 2013). Khodayari et al. (2013) نانو نقره را عامل موثر در افزایش تجمع سنگوئینارین و تبایین در *Papaver somniferum* L. دانستند. همچنین گزارشی مبنی بر اینکه الیسیتورهای نانو نقره میزان آلوئین را در سوسپانسیون سلولی آلوئه‌ورا افزایش داد وجود دارد (Raei et al. 2012). اخیرا نیز در تحقیقی اثر سه نانو الیسیتور اکسید روی، اکسید سیلسیوم و نانو نقره بر سوسپانسیون سلولی ریشه گیاه شقایق ایرانی (*Papaver bracteatum*) بررسی شد و نشان داده شد که بالاترین میزان مورفین در تیمار نانونقره و بالاترین میزان کدئین در تیمار نانواکسید سلیسیوم ۴۸ ساعت پس از اعمال الیسیتور بدست آمدند (Asadollahi et al. 2014). از دیگر الیسیتورهای غیرزیستی که برای افزایش تجمع متابولیت‌ها استفاده شده لیزر کم توان هلیوم- نئون[5] است که تاثیر آن بر القای سه متابولیت ثانویه آلوئنین، باربالوئین و ایزوباربالوئین در کشت سوسپانسیون سلولی و همچنین کالوس‌های گیاه آلوئه‌ورا مطالعه شد و اثر مثبت آن روی تجمع سه متابولیت گزارش شده است (Tavakoli et al. 2014). الیسیتور فراصوت نیز به عنوان

[1] Chitosan
[2] Crocin
[3] Stigma-like Structure
[4] Charcoal
[5] Helium-Neon soft laser

Archive of SID
www.SID.ir

یک الیسیتور غیرزیستی می‌تواند سبب القای مکانیسم دفاعی گیاه و سنتز متابولیت‌های ثانویه شود و اثر افزاینده معنی‌دار آن بر تجمع متابولیت‌های آلوئین و آلوئه امدین در کشت سلولی سوسپانسیون گیاه آلوئه‌ورا گزارش شده است (Maleki et al. 2014).

مهندسی متابولیک و تولید متابولیت‌های ثانویه

مهندسی متابولیک عبارت از تغییر هدفمند مسیرهای متابولیکی یک موجود زنده به منظور درک و شناسایی بهتر مسیرهای سلولی و استفاده از این اطلاعات برای انتقال شیمیایی، هدایت انرژی و مونتاژهای سوپر مولکولی[1] است (Lessard 1996). بکارگیری این روش‌ها در گیاهان امکان دستکاری مسیرهای بیوشیمیایی گیاه را فراهم کرده و گیاهان تراریختی تولید می‌شود که میزان تولیدات محصولات طبیعی آنها به جهت منافع تجاری، زراعی و ویژگی-های مناسب پس از برداشت تغییر یافته باشد (Kinney 1998). در دهه‌های اخیر کشت سلولی گیاهان به عنوان ابزار قدرتمندی برای تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه از جمله مواد شیمیایی با خلوص بالا، حشره کش‌ها، خوشبوکننده‌ها، طعم‌دهنده‌ها و مواد آرایشی و ... شناسایی شده است (Ramachandara and Ravishankar 2002). ولی علی‌رغم تلاش‌های زیاد در زمینه تولید درون‌شیشه‌ای از آنجا که میزان تولید برای تجاری شدن آنها کافی نیست مهندسی متابولیک می‌تواند راهکارهای مفیدی برای افزایش تولید و کارایی متابولیت‌ها ارایه دهد. تولید متابولیت‌های ثانویه با فعالیت‌های فیزیولوژیک متعدد توسط گیاهان مشکلاتی را در پی دارد که از جمله آنها میزان تولید کم، ناهمگونی کیفیت و دسترسی محدود به مواد خام اولیه می‌باشند. در حالی‌که میکروارگانیسم‌ها تحت شرایط کنترل شده قادرند متابولیت‌های اولیه و ثانویه خود را تولید کنند و این ویژگی میزان کارایی تولید و یکنواختی این محصولات را تضمین می‌کند. به منظور غلبه بر مشکلات تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان یک سامانه میکروبی[2] برای تولید آلکالویید ایزوکینولین گیاهی توسط Sato and Kumagai (2013) ساخته شد که موفق شدند از این سامانه میکروبی برای تولید Isoquinoline Alkaloids (IQA) به عنوان یک مدل که در آن مسیر متابولیکی گیاه و میکروب در یک سیستم متحد شده‌اند، استفاده کنند و بر مشکلات مرتبط بر تولید متابولیت‌های ثانویه غلبه کنند (Sato and Kumagai 2013). این تحقیق شامل سه بخش بود:

۱- شناسایی مسیر ساخت IQA در سطح مولکولی در سلول‌های گیاهی کشت شده و تغییرات آنها با کمک مهندسی متابولیک. به دلیل میزان پایین IQA در گیاهان و فعالیت آنزیمی پایین آن ساختار مولکولی آن تا مدت‌ها شناخته نشد. در این مرحله یک لاین سلولی کشت شده از گیاه دارویی *Coptis japonica* که میزان IQA بالایی تولید می‌کرد انتخاب شده، ژن‌های درگیر در سنتز IQA کلون و توالی‌یابی شدند و بدین ترتیب مراحل شناسایی ساختار مولکولی IQA تکمیل شد. از بین ژن‌های کلون شده هفت ژن برای تشکیل سامانه میکروبی جهت تولید IQA گیاهی انتخاب شد. سپس روش انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم برای انتقال دو ژن از گیاه *Coptis japonica* به کشت سلولی گیاه دارویی *Eschscholzia californica* طراحی شد. با این روش دو ژن از *Coptis japonica* شامل *scoulerine 9-O-methyltransferase* و دیگری *norcoclaurine 6-O-methyltransferase* به کشت سلولی *E.californica* انتقال داده شد که به ترتیب بربرین و سانگوینارین را با موفقیت تولید کرد و نتایج نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری بالای روش ساختگی[3] تولید IQA نسبت به تغییرات ژنتیکی آن بود (Sato et al. 2007)؛

۲- نتایج پژوهش در متابولیسم اسیدآمینه معطر در میکروارگانیسم ها برای ساخت سامانه میکروبی تولید IQA بکار گرفته شد. ابتدا آنزیم دی‌کربوکسیلاز اسیدهای آمینه[4] در میکروارگانیسم‌های مختلف غربال شدند تا اینکه آنزیم جدیدی در *Micrococcus* یافت شد که برای اولین بار به صورت کریستال از میکروارگانیسم استخراج شد. (Nakazawa et al. 1981) این آنزیم با دی کربوکسیله کردن ال- تیروزین قادربه تولید تیرامین بود. سپس یک آنزیم معطر اختصاصی دی کربوکسیله کردن اسید آمینه در *Pseudomonas* کشف شد که ال- دوپا را به دوپامین تبدیل می-کرد. در مرحله بعد آنزیم‌های اکسیداز اسیدهای آمینه

[1] Supramolecular assembly
[2] Microbial platform
[3] Synthetic
[4] Amino acid decarboxylase

Archive of SID
www.SID.ir

میکروارگانیسم‌های متفاوت غربال شدند و بر حسب نتایج بدست آمده یک طبقه‌بندی جدید برای آنزیم‌هایی که در مرکز فعال خود عنصر Cu و یا FAD داشتند ارایه شد. در مرحله بعد یک منو آمین اکسیداز در *Micrococcus* کشف و به شکل کریستالی استخراج شد که قادر بود تیرامین را به *4-hydroxyphenylacetaldehyde* تبدیل کند. همراه با این آنزیم محصولی با فعالیت غیر آنزیمی *norlaudanosoline* از سوبسترای دوپامین و 3, 4-DHPAA کشف شد که ساختار اولیه آن شبیه به *norcoclaurine* بود که اولین محصول مسیر بیوسنتزی IQA در گیاهان است. با توجه به این مشاهدات ایده تولید IQA گیاهی بوسیله میکروارگانیسم‌ها شکل گرفت و ژن‌های این آنزیم و-*L amino acid decarboxylase DOPA-specific* بعدا برای ساخت سامانه میکروبی تولید IQA گیاهی استفاده شدند (Nakazawa et al. 1981; Sato and Kumagai 2013)؛

۳- ساخت سامانه میکروبی به منظور تولید IQA گیاهی. Sato and Kumagai (2013) برای اولین بار در دنیا یک سامانه میکروبی را به منظور تولید IQA گیاهی با موفقیت ساختند. این سامانه شامل چهار مدل بود: "مدل ساختگی کلی اسید آمینه معطر" که با دستکاری ژنتیکی سیستم متابولیکی باکتری اشرشیاکولی بدست آمد که مشکل تولید همزمان ال-تیروزین را از گلوکز به عنوان تنها منبع کربن حل کرد؛ "مدل Tailor made biosynthetic" که برای تولید دو پیش ساز IQA، دوپامین و3, 4-DHPAA از ال-تیروزین با استفاده از سه ژن میکروبی کلون شده، بهینه شده بودند؛ "fundamental IQA synthetic module" برای تولید اس- رتیسیلین ماده کلیدی در مسیر ساخت IQA که شامل چهار ژن کلون شده از *C. japonica* بود؛ و " ad hoc IQA synthetic module" شامل سه ژن کلون شده *C. japonica* که IQA متفاوتی را از اس- رتیکولین تولید می‌کنند. سه مدل اول در سلول های اشیرشیاکولی نصب شدند و مدل چهارم در مخمر. کشت همزمان باکتری‌های اشرشیاکولی و سلول‌های مخمر اس- رتیکولین و دیگر IQAها را با کارایی بالا تولید کردند که مفید بودن سامانه میکروبی ساخته شده برای تولید IQA را نشان می‌داد. بدین ترتیب روش نوینی برای تولید میکروبی متابولیت‌های ثانویه گیاهان با استفاده از IQA به عنوان یک مدل ابداع شد که باعث توسعه علوم سینتتیک بیولوژی و مهندسی متابولیک شدند (Sato and Kumagai 2013).

تلقیح و دستکاری ژنتیکی ریشه‌های مویین در تولید متابولیت‌های ثانویه

یکی از روش‌های متداول تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که در ریشه ساخته می‌شوند تلقیح ریشه با *Agrobacterim rhizogene* است (Palazon et al. 1997). تلقیح گیاهان با میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌های ریزوسفری مسیرهای خاص متابولیت‌های ثانویه را تحریک می‌کنند (Ghorbanpoor et al. 2011). تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین تلقیح شده ناشی از آلودگی با آگروباکتریوم بوده و به طور معمول نسبت به متابولیت‌های تولید شده در گیاهان دست نخورده عملکردی مشابه و یا بالاتر دارند (Sevon and Oksman-Caldenty 2002). این ویژگی به دلیل پایداری ژنتیکی و رشد سریع عمومی در محیط کشت ساده فاقد هورمون‌های گیاهی، آنها را برای مطالعات بیوشیمیایی که روی گیاهان معمولی مشکل است، مناسب می‌سازد. در زمان آلوده کردن گیاه، آگروباکتریوم بخشی از T-DNA[1] واقع شده در پلاسمید Ri[2] را به سلول‌های گیاهی منتقل می‌کند و ژن‌های این قطعه همزمان با ژن‌های داخلی سلول‌های گیاهی تظاهر می‌یابند. برخی از نژادهای آگروباکتریوم *A. rhizogene* مانند A4، T-DNA با دو قسمت TL-DNA و TR-DNA دارند که هر کدام از آنها می‌توانند جداگانه به ژنوم گیاهی متصل شوند. دو سری از ژن‌های *pRi* در روند القای ریشه درگیرند: ژن‌های *aux* که در ناحیه TR پلاسمید قرار دارند و ژن-های *rol* (root loci) که در ناحیه TL قرار گرفته‌اند (Jouanin 1989). ژن‌های *ags* که مسئول بیوسنتز اوپین در بافت‌های تراریخته[3] هستند نیز در ناحیه TR قرار گرفته‌اند (Binns and Tomashow 1988). اوپین‌ها در سلول‌های گیاه که انتقال در آنها انجام شده ساخته می‌شود و به عنوان منبع نیتروژن و کربن توسط آگروباکتریوم استفاده می‌شوند. همبستگی بین ژن *rolC* و آلکالوییدهای تروپان (Fumanova and Syklowska 1998)، آلکالوییدهای *Catharanthus roseus* (Palazon et al. 1998) و

[1] Transferred DNA
[2] Root inducing plasmid
[3] Transformed

Archive of SID
www.SID.ir

تولید جینسنوساید (Bulkagov et al. 1998) گزارش شده است. در تحقیق دیگری که قطعات برگ توتون، هیبرید *Dubisia* و گیاه *Datura metal* با نژاد A4 *A. rhizogene* تلقیح شده ظرفیت تولید آلکالوییدهای مشتق شده از پوترسین از جمله نیکوتین[1]، هیوسیامین[2] و اسکوپولامین[3] در ریشه افزایش یافت. در این آزمایش ریشه‌های مویین با دو مورفولوژی بدست آمد که یک نوع آنها ریشه‌های مویین معمولی بود که ظرفیت تولید آلکالوییدهای آنها بالا بود و نوع دیگر ریشه‌های کالوس مانند که سریع‌تر رشد کرده و میزان آلکالویید کمتری تولید می‌کرد. ژن *aux1* آگروباکتریوم که در TR-DNA واقع شده در تمام ریشه‌های با مورفولوژی کالوس مانند یافت شد و نقش معنا دار این ژن را در بروز مورفولوژی ریشه‌های انتقال داده شده نشان داد و از طرفی دیگر اهمیت داشتن مورفولوژی معمولی ریشه‌های مویین را در تولید متابولیت‌های ثانویه مشخص می‌کرد (Moyano et al. 1999). در گزارش دیگری باکتری‌های ریزوسفری را عاملی موثر در تولید محتوی و عملکرد آلکالوییدها در گیاه بذرالبنج *Hyoscyamus niger* دانستند و باور داشتند که باکتری‌های ریزوسفری با تولید هورمون‌های رشد به عنوان محرک درستنز تروپان آلکالوئیدها عمل می‌کنند که در نتیجه آن محتوی و عملکرد آلکالوییدها افزایش پیدا می‌کند (Ghorbanpoor et al. 2011).

کشت ریشه‌های تراریخت یک روش زیست فناورانه موثر برای استفاده از سلول‌های گیاهی هستند. انتقال از طریق آگروباکتریوم *A. rhizogenes* این مزیت را دارد که هر ژن با منبع خارجی را که در یک وکتور باینری قرار گرفته را می‌توان به ریشه‌های مویین انتقال داد. همچنین این امکان را فراهم می‌کنند که یک متابولیت ثانویه را به طور انتخابی در گیاه تغییر داد یا اینکه با القای ژن‌های کد کننده آنزیم‌هایی که کاتالیز هیروکسیل کننده‌ها، متیله کننده‌ها و گلیکوزیله کننده‌ها را به عهده دارند، باعث ترشح متابولیت‌ها شد. به عنوان مثال می‌توان به کشت ریشه‌های مویین گیاه *Nicotiana rustica* با ژن دی کربوکسیلاز اورنیتین[4] از مخمر و *Peganum harmala* با ژن دی‌کربوکسیلاز تریپتوفان از *Catharanthus roseus* اشاره کرد که متابولیت‌های ثانویه نیکوتین و سروتونین[5] را به دلیل تظاهر ژن انتقال یافته از مخمر، به میزان بالایی تولید کردند (Berlin et al. 1993). همچنین ریشه‌های مویین تراریخت در کلزا که در بردارنده ژن بیوسنتز گلوتامین از سویا بودند تا سه برابر بیشتر فعالیت آنزیمی نشان دادند (Downs et al. 1994). آلکالوئیدهای گروه مورفین در خشخاش از دو مولکول اسید آمینه ال– تیروزین توسط حداقل ۱۷ مرحله آنزیمی طی چندین واکنش اکسیداتیو پیوسته سنتز می‌شوند. اولین آنزیم کلیدی در این مسیر ال– تیروزین دی‌کربوکسیلاز (TYDC) می‌باشد. تیروزین دی‌کربوکسیلاز یک آمینو اسید دی‌کربوکسیلاز حلقوی رایج و عمومی در گیاهان می‌باشد که در گونه‌های مختلف گیاهی بیوسنتز تعداد زیادی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه به آن وابسته می‌باشد. با انتقال این ژن از طریق آگروباکتریوم و تشدید بیان آن در گیاه خشخاش، میزان آلکالوئیدهای گروه مورفین در نمونه‌های گیاهی تراریخت نسبت به شاهد افزایش یافت (Koohzadi et al. 2012). راهکار کشت ریشه‌های مویین تراریخت و تلقیح ریشه‌ها با آگروباکتریوم می‌تواند برای تولید تجاری ترکیبات دارویی مهم مد نظر قرار گیرد اما متاسفانه تلاش‌های مذکور تا به امروز به نقطه عطف اقتصادی مطلوب نرسیده است و هنوز هم تولید این متابولیت‌ها در سطح وسیع و از گیاه کامل تنها روش موفق و اقتصادی به نظر می‌رسد (Ghorbanpoor et al. 2011).

نقش قارچ‌های همزیست[6] در تولید متابولیت‌های ثانویه در شیشه سه نظریه در مورد منشا متابولیسم متابولیت‌های ثانویه در گیاهان وجود دارد. یکی اینکه هم گیاهان هم میکروب‌ها در مسیر ساخت این محصولات طبیعی مشارکت دارند. نظریه دیگر انتقال ژن بین گیاه و میکروب در زمان‌های دور را پیشنهاد می‌دهد و نظریه سوم معتقد است که یا گیاه یا قارچ این متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند و آن را به همزیست خود انتقال می‌دهند (Wink 2005). مطالعاتی که با استفاده از پیش‌سازهای اسید آمینه نشان‌دار شده در مسیرهای بیوسنتزی انجام شده نشان می‌دهند که گیاهان و قارچ-های داخلی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مسیرهای بیوسنتزی

[1] Nicotin
[2] Hyoscyamine
[3] Scopolamine
[4] Ornithin decarbosylase
[5] Serotonin
[6] Endophytes

Archive of SID
www.SID.ir

مشابه اما جداگانه دارند (Jennewein et al. 2001). ترکیب عوامل القاگر در گیاهان و قارچ‌های هم‌زیست باعث افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه در هر دو آنها می‌شود و می‌توان نتیجه گرفت که قارچ‌ها نقش مهمی در بیوسنتز این ترکیبات دارند (Zhang et al. 2009; Li et al. 2009). بنابراین هم‌زیستی و تقابل بین گیاهان و قارچ‌ها و تاثیر آنها بر یکدیگر در زمان تولید ترکیبات زیستی مهم مانند کامپتوتسین[1]، وینبلاستین[2] و پادوفیلوتوکسین[3] نیاز به مطالعه دارد و می‌تواند موضوع خوبی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از علم ژنتیک و مهندسی متابولیک باشد (Engels et al. 2008). از قارچ‌های موثر در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه قارچ *Aspergillus niger* می‌باشد که باعث افزایش قابل توجه تجمع آلیزارین[4] در کشت ریشه‌های مویین از گیاه روناس می‌شود (Ghorbani 2014).

بی‌حرکت کردن سلول‌ها و افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه بی‌حرکت کردن روشی است که به کمک آن فعالیت سلول‌ها و آنزیم‌های کاتالیز کننده محدود می‌شود و تثبیت کردن آنها مانع از ورود آنها به فاز مایع می‌شود (Yeoman et al. 1990). پیشرفت-هایی که در زمینه راهکارهای انبوه‌سازی و روش بی‌حرکت کردن صورت گرفته‌است به تولید ترکیبات گیاهان با ارزش افزوده بالا از طریق کشت سلولی کمک می‌کند (Komaraiah 2003). سلول‌های گیاهی بی‌حرکت شده جهت تبدیل زیستی یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای پیش‌سازهای متابولیت‌ها به محصول نهایی مورد نظر و ساخت متابولیت‌های ثانویه به کار گرفته شده‌اند (Ramachandra and Ravishankar 2002). بی‌حرکت کردن سلول‌های گیاهی به عنوان کاتالیزکننده‌های زیستی[5] مزایایی نسبت به بی‌حرکت کردن سیستم‌های آنزیمی دارد. در زمان استفاده از آنزیم‌های بی‌حرکت شده عواملی چون pH، دما و وجود کوفاکتورها در مخلوط واکنش باید کنترل شوند. آنزیم‌های بی‌حرکت شده عموما به واکنش‌های یک مرحله‌ای اضافه می‌شوند که در زمان جداسازی آنزیم از موجود زنده فعالیت آن تا حدی دچار اختلال می‌شود (Ramachandra and Ravishankar 2002). در مقایسه با آنزیم‌های بی‌حرکت شده استفاده از سلول‌های بی‌حرکت شده مزایایی دارد از جمله اینکه قادر به انجام واکنش‌های چند آنزیمی هستند، با انتخاب سلول‌های دارای فعالیت بیوسنتزی بالا فعالیت‌های کاتالیکی افزایش می‌یابد و همچنین نیازی به افزودن کوفاکتورها نیست چرا که خود سلول‌ها قادرند آنها را تولید کنند که همین عوامل باعث می‌شود کار کردن با سلول‌های بی‌حرکت شده نسبت به آنزیم‌های بی‌حرکت شده راحت‌تر باشد و به عنوان کاتالیز کننده‌های زیستی حایز اهمیت باشند (Ramachandra and Ravishankar 2002). چنانچه هدف از بکارگیری سلول‌های بی‌حرکت شده تولید متابولیت‌های ثانویه باشد به منظور بهبود دستیابی به محصول مورد نظر رعایت یکسری نکات ضروری است. محصول مورد نظر نباید به طور مستقیم و پر اهمیت در رشد گیاه گیاه دخیل باشد؛ به منظور جلوگیری از فروپاشی محیط بی‌حرکت کننده و اختلال در روند تولید متابولیت‌های ثانویه رشد سلول‌ها باید کاهش یابد؛ سلول‌های بی‌حرکت شده باید قدرت زنده ماندن طولانی، ظرفیت بیوسنتزی بالا و توانایی تولید پایدار متابولیت‌های ثانویه را داشته باشند؛ محصول مورد نظر باید پس از تولید از سلول خارج شود و به محیط کشت وارد شود (Payne et al. 1991).

روشی که به طور گسترده برای بی‌حرکت کردن سلول‌ها استفاده می‌شود احاطه کردن سلول‌ها با استفاده از یک نوع ژل و یا ترکیبی از چند ژل مختلف است که در اطراف سلول‌ها پلیمریزه می‌شود (Noavis 1988). در بین ژل‌های مورد استفاده برای بی‌حرکت سلول‌ها آلژینات کلسیم به جهت غیر سمی بودن بیشترین کاربرد را دارد. از دیگر ژل‌های مورد استفاده در بی‌حرکت کردن سلول‌ها آگار، آگارز، ژلاتین، کاراگینان و پلی اکریلامید می‌باشند (Nilsson et al. 1983). در مواردی نیز از فوم پلی‌یورتان[6] و غشاهای فیبری توخالی[7] جهت بی‌حرکت کردن سلول‌ها استفاده می‌شود (Ramachandra and Ravishankar 2002). مطالعات مختلفی به منظور بررسی اثر بی‌حرکت کردن به کمک آلژینات کلسیم بر تجمع متابولیت‌های ثانویه انجام شده‌اند

[1] Camptothecin
[2] Vinblastine
[3] Podophyllotoxin
[4] Alizarin
[5] Biocatalyst
[6] Polyurethane foam
[7] Hollow fibre membranes

Archive of SID
www.SID.ir

و افزایش تولید محصولات موردنظر را نسبت به شاهد گزارش کردند که از آن جمله می‌توان به تولید متابولیت‌های پلامباگین[1] (Komaraiah 2003)، بربرین (Kobayashi et al. 1987)، تیوفنیز[2] (Katel et al. 1987)، آنتراکوینونز[3] (Brodelius et al. 1979)، وانیلین[4] (Johnson et al. 1996) و ال-دوپا[5] (Wichers et al. 1983) اشاره کرد. در پژوهش‌های دیگری از غشاهای فیبری در تولید کافئین[6] (lang et al. 1990) و فوم پلی یورتان در تولید کاپسایسین[7] (Lindsey and Yeoman 1984) به عنوان محیط بی‌حرکت کننده استفاده شده‌است.

نتیجه‌گیری

پیشرفت‌هایی که در زمینه علم زیست فناوری صورت گرفته منجر به ایجاد روش‌های نوینی چون کشت سلولی برای تولید ترکیبات شیمیایی گیاهان و تجاری‌سازی آنها شده است. مزیت این روش-ها نسبت به روش‌های سنتی ساخت متابولیت‌های ثانویه تحت شرایط کنترل شده و مستقل از شرایط اقلیمی است که می‌تواند منابع تجدیدپذیر قابل اعتمادی برای محصولات طبیعی مورد نیاز ایجاد کند. تولید ترکیبات دارویی در شیشه پیشرفت چشمگیری در زمینه علوم گیاهی محسوب می‌شود و استفاده از ابزارهای ژنتیکی، شناسایی ساختار متابولیت‌های ثانویه و مسیرهای متابولیکی آنها می‌تواند به تولید تجاری این محصولات کمک کند. نیاز رو به رشد بازار به ترکیبات طبیعی برای تولید دارو در کنار کمبود مواد اولیه و عملکرد پایین تولید به ظهور روش‌های نوین زیست فناوری برای تولید متابولیت‌های ثانویه در سطح انبود کمک کرد. تا به امروز هنوز علم کافی در مورد مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات شیمیایی در گیاهان وکشت‌های سلولی وجود ندارد بنابراین ارایه راهکارهایی جهت توسعه اطلاعات در سطح مولکولی و سلولی این مسیرها یک نیاز اصلی است. به کارگیری روش‌های نوین زیست مولکولی و تولید کشت‌های تراریخته می-تواند مسیرهای بیوسنتزی را به شکل موثری تحت تاثیر قرار دهد و گام بزرگی در جهت کاربردی‌تر کردن کشت‌های سلولی برای تولید متابولیت‌های ثانویه در سطح انبوه و تجاری خواهد بود.

[1] Plumbagin
[2] Thiophenes
[3] Anthraquinones
[4] Vanillin
[5] L-DOPA
[6] Caffeine
[7] Capsaicin

منابع

Andrey VL, Wan-Pyo H, Kenneth CS (2006) Biotechnology for the production of crocin in callus culture of *Gardenia jasminoides Ellis*. Current Topics in Plant Biology 2:161-165.

Asadollahi E (2014) Effect of some nano elicitors on active compound of *Papaver bracteatum*. Dissertation. University of Tehran. Department of Agronomy and plant breeding (In Farsi).

Berlin J, Ruegenhagen C, Dietze P, Fecker LF, Goddjin OJM, Hoge JHG (1993) Increased production of serotonin by suspension and root cultures of *Peganum harmala* transformed with a tryptophan decarboxylase cDNA clone from *Catharanthus roseus*. Transgenic Research Journal 2:336-344.

Binns AN, Tomashow JV (1988) Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. Annual Review Microbiology 42:575-606.

Bondarian F, Torabi S, Omidi M, Bahreini M (2013) Study of callus induction and regeneration of *Papaver somniferum* L. Current Opinion in Biotechnology 24S:S28-S47.

Brodelius P, Deus B, Mosbach K, Zenk MH (1979) Immobilized plant cells for the production of natural products. FEBS Letters 103:93-7.

Bulgakov VP, Khodakovskaya MV, Labetskaya NV, Chernoded GK, Zhuravlev YN (1998) The impact of plant *rol* C oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. Phytochemistry 49:1929-1934.

Choi YE, Yang DC, Yoon ES, Choi KT (1999a) Highefficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from preplasmolysed cotyledons of Panax ginseng and possible dormancy of somatic embryos. Plant Cell Reports 18:493-499.

Choi YE, Yang DC, Yoon ES (1999b) Rapid propagation of Eleuterococcus senticosus via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings. Plant Cell Tissue and Organ Culture 58:93-97

Downs CG, Christey MC, Davies KM, King GA, Seelye JF, Sinclair BK, Stevenson DG (1994) Hairy roots of *Brassica napus*: II glutamine synthase over expression alters ammonia assimilation and the response to phosphinothiricin. Plant Cell Reports 14:41-46.

Engels B, Dahm P, Jennewein S (2008) Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. Metabolic Engineering 10:201-206.

Fulzele P (2005) Bioreactor for production of bioactive compounds. Indian Association of Nuclear Chemists and Bulletin 4:35-42.

Archive of SID
www.SID.ir

Expression in Papaver somniferum L. 2nd National Congress on Medicinal Plants. Iran,Tehran (In Farsi).
Kim JW, Kim HS (2001) Mass production of Siberian ginseng (Eleutherococcus senticosus) somatic embryos by cell culturing. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine 1:34-38.
Kim JS, Lee SY, Park SU (2008) Resveratol production in hairy root culture of peanut, *Arachys hypogaea* L. transformed with differet *Agrobacterium rhizogenes* strains. African Journal of Biotechnology 7:3788-3790.
Kinney AJ (1998) Manipulating flux through plant metabolic pathways. Current Opinion on Plant Biology 1:173-178.
Kiong AL, Mahmood M, Fodzillan NM, Daud SK (2005) Effects of precursor supplementation on the production of triterpenes by *Centella asiatica* callus culture. Pakistan Journal of Biological Sciences 8:1160-1169.
Kmaraiah P, Ramakrishna SV, Reddanna P, Kavikishore PB (2003) Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and it situ adsorption. Journal of Biotechnology 10:181-187
Kobayashi Y, Fukui H, Tabata M (1991) Effect of carbon dioxide and ethylene on berberine production and cell browning in Thalictrum minus cell cultures. Plant Cell Reports 9:496-9.
Koohzadi F, Omidi M, Solouki M, Mahdinejad N, Alizadeh H (2012) Overexpression of *TYDC2* in medicinal plant opium poppy to increase its medicinal alkaloids contents. Modern genetics journal 7:343-352 (In Farsi).
Lessard P (1996) Metabolic engineering, the concept coalesces. Natural Biotechnology 14:1654-1655
Li YC, Wen-Yi T (2009) Effects of paclitaxel-producing fungal endophytes on growth and paclitaxel formation of *Taxus cuspidate* cells. Plant Growth Regulators 58:97-105.
Lindsey K, Yeoman MM (1987) Immobilized plant cell culture systems. In Neumann KH, Barz W, Reinhard E, editors.Primary and secondary metabolism of plant cell cultures Berlin: Springer-Verlag. 304-315.
Luo SW, Huang WH, Gao GY, Yu RC (1964) Tissue culture of Panax ginseng. Plant Physiology Communication 2:26-38.
Maleki M (2014) Effect of methyl jasmonate and ultrasonic on secondary metabolite production in cell suspension culture of *Aloe barbadensis Mill.* Dissertation. University of Tehran. Department of Agronomy and plant breeding (In Farsi).
Moyano E, Fornalé S, Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Morales C, Piñol MT (1999) Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. Phytochemistry 52:1287-1292.
Nakazawa H, Kumagai H, Yamada H (1981) Aromatic L-amino acid decarboxylase from *Micrococcus percitreus*. Purification, crystallization and properties. Agricultural and Biological Chemistry 45:2543-2552.
Namdeo AG (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Pharmacognosy Reviews 1:69-79.
Novais J (1988) Methods of immobilization of plant cells. Plant cell biotechnology. NATO ASI Series. New York: Springer 353-63.
Furmanova M, Syklowska BK (2000) Hairy root cultures of *Taxus* x *media* var. Hicksii Rehd. as a new source of paclitaxel and 10- deacetylbaccatin III. Biotechnology Letters 22:606-616.
Furuya T, Yoshikawa, T Orihara Y, Oda H (1984) Studies of the culture conditions for Panax ginseng cells in jar fermentors. Journal of Natural Products 47:70-75.
Ghorbani M (2014) Effect of elicitation on Alizarin production in hairy root culture of Madder *Rubina tinctorum* L. Dissertation. University of Tehran. Department of Agronomy and plant breeding (In Farsi).
Ghorbanpoor M, Majnoon hosseini N, Reza zadeh Sh, Omidi M, Khawazi K, Hatami M (2011) Nitrogen effects on black henbane (*Hyoscyamus niger*) growth, biomass allocation, root and shoot alkaloids production under water decici stress. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 4:40 (In Farsi).
Giri A, Narasu ML (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology Advances. 18:1-22.
Gui Y, Guo Z, Ke S, Skirvin RH (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopanax senticosus.* Plant Cell Reports 9:514-516.
Huang KC (1993) The Pharmacology of Chinese Herbs.CRC press, Boca Raton, FL 21-45.
Isoda S, Shoji J (1994) Studies on the cultivation of Eleutherococcus senticosus Maxim. II On the germination & raising of seedlings. Natural Medicine 48:75-81.
Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, Croteau RB (2001) Taxol biosynthesis: Taxane 13-hydroxylase is a cytochrome P450- dependent monooxygenase. Proceedings of the National Academy of Sciences 98:13595-13600.
Jeong GA, Park DH (2007) Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system. Applied Biochemistry and Biotechnology 130:436-446.
Johnson TS, Ravishankar GA (1996) Precursor biotransformation in immobilized placental tissues of Capsicum frutescens Mill: I. Influence of feeding intermediate metabolites of the capsaicinoid pathway on capsaicin and dihydrocapsaicin accumulation. Journal of Plant Physiology 147:481-5.
Jouanin L (1984) Restriction map of an agropine-type Ri-plasmid and its homologies with Ti-plasmids. Plasmid 12: 91-102.
Karppinen K, Hokkanen J, Tolonen A, Maltila S, Hohtola A (2007) Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. Phytochemistry 68:1038-1045.
Karuppusamy S (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research 3:1222-1239.
Ketel D, Hulst A, Gruppen H, Breteler H, Tramper J (1978) Effects of immobilization and environmental stress on growth and production of nonpolar metabolites of Tagetes minuta cells. Enzyme Microb Technology 9:303-7.
Khodayari M, Omidi M, Shah nejat boushahri A, Naghavi M (2013) Effect of Elicitors on some Alkaloids Gene

Archive of SID
www.SID.ir

Omidi M, Farzin N (2012) Biotechnology approaches for improvement of medicinal plants. Modern Genetics Journal 7:209-220 (In Farsi).
Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81:287-300.
Palazon J, Moyano E, Bonfill M, Cusido RM, Pinol MT (2006) In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. (Ed. Teixeira da Silva, J. A.) Global Science Books, Ltd: London, UK 209-221
Payne G, Bringi V, Prince C, Shuler ML (1991) Plant cell and tissue culture in liquid systems. Munich: Hanser Publication 1-10.
Philipson JD (1990) Plants as source of valuable products. In: B.V. Chalwood and M.J. Rhodes (Eds.), Secondary products from plant tissue culture, Oxford, Clarendon Press 1-21.
Ramachandra SR, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20:1001-153.
Raei M (2012) Effect of abiotic elicitors on tissue culture of Aloe Vera. Dissertation. Islamic Azad University of Science and Research (In Farsi).
Rao RS, Ravishankar GA (2002) Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20:101-153.
Sato F, Inai K, Hashimoto T (2007) Metabolic engineering in alkaloid biosynthesis: case studies in tyrosine- and putrescine-derived alkaloids. In: *Applications of Plant Metabolic Engineering* (eds. Verpoorte, R., Alfermann, A. W., and Johnson, T. S.), Springer, New York 145-173.
Sevon N, Oksman-Caldentey KM (2002) *Agrobacterium rhizogenes*mediates transformation: Root cultures as a source of alkaloids. Planta Medica 68:859-868.
Sato F, Kumagai H (2013) Microbial production of isoquinoline alkaloids as plant secondary metabolites based on metabolic engineering research. Proceedings of the Japan Academy Series B 89:165-182.
Sevon N, Oksman-Caldentey KM (2002) *Agrobacterium rhizogenes*mediates transformation: Root cultures as a source of alkaloids. Planta Medica 68:859-868.
Shinde AN, Malpathak N, Fulzele DP (2009) Enhanced production of phytoestrogenic isoflavones from hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. Biotechnology Bioprocess Engineering 14: 288-294.
Tabatabaei BE, Omidi M (2012) Plant cell and tissue culture. Tehran University press.Iran,Tehran (In Farsi).
Takayama S, Misawa M (1981) Mass propagation of Begonia hiemalis plantlet by shake culture. Plant Cell Physiology 22:461-467.
Tavakoli M (2014) Effect of laser on secondary metabolites production in cell suspension culture of *Aloe vera*. Dissertation. University of Tehran. Department of Agronomy and Plant Breeding (In Farsi).
TuleckeW, Nickell LG (1959) Production of large amounts of plant tissue by submerged culture. Science 130:863-864.
Wink M, Alfermann AW, Franke R, Wetterauer B, Distl M, Windhovel J, Krohn O, Fuss E, Garden, H, Mohagheghzaden A, Wildi E, Ripplinger P (2005) Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant *in vitro* cultures: anticancer agents. Plant Genetic Resources 3:90-100
Wichers HJ, Malingre ThM, Huizing HJ (1983) The effect of some environmental parameters on the production of L-DOPA by alginate entrapped cells of Mucuna pruriens. Planta 158:482-6.
Wyk BEV, Wink M (2004) Medicinal plants of the world. Pretoria, Briza.
Yasuda S, Satoh K, Isshii T, Furuya T (1972) Studies on the cultural conditions of plant cell suspension culture. In: Terui G (ed) Fermentation Technology Today Society. Fermen. Technology. Osaka, Japan 697-703.
Yoshikawa T, Furuya T (1987) Saponin production by cultures of Panax ginseng transformed with Agrobacterium rhizogenes. Plant Cell Reports 6:449-453.
Yeoman MM, Holden MA, Corchet P, Holden PR, Goy JG, Hobbs MC (1990) Exploitation of disorganized plant cultures for the production of secondary metabolites. Charlwood BV, Rhodes MJC, editors. Secondary products from plant tissue culture. Oxford: Clarendon 66-169.
Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y (1996) Methyl jasmonate induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in Taxus cell suspension cultures. Natural Biotechnology 14:1129-1132.
Yu KW, Gao WY, Hahn EJ, Paek KY (2001a) Effects of micro elements and nitrogen source on adventitious root growth and ginsenoside production in ginseng (Panax ginseng C. A. Meyer). Journal of Plant Biology 44:179-184.
Zare mehrjardi M, Bi hamta M, Omidi M, Naghavi M (2012) Effect of some elicitors on Artemisin production and expression of main genes in its pathway in *Artemisia annua*. Dissertation.University of Tehran (In Farsi).
Zhang P, Peng-Peng Z, Long-Jiang Y (2009) An Endophytic Taxol- Producing Fungus from Taxus media, *Cladosporium cladosporioides* MD2. Current Microbiology 59:227-232.
Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23:283-333.

Archive of SID

www.SID.ir