

بیوراكتورها و استفاده بهينه از پتانسيل زيست بوم گياهان دارويي و متابوليت‌هاي ثانويه

گياهي

هانا رمشي^۱

چکیده

بکارگیری سلول‌ها، بافت و اندام‌های گیاهی به منظور تولید ترکیبات طبیعی و نو ترکیب دارای ارزش تجاری، توجه بسیاری را طی دهه‌های گذشته به خود جلب کرده است. تولید محصولات نو ترکیب از طریق کشت سوسپانسیون سلول گیاهی چندین مزیت 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. با توجه به افزایش روزافزون جمعیت جهان و ضرورت استفاده بهینه از ظرفیت‌های طبیعت؛ همچنین 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 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 مهندسين شیمی در راستای به کارگیری "بیوراكتورها" امکان پذیر شده است. سیستم کشت بیوراكتور مزیت‌هایی را نسبت به سیستم کشت کلاسیک ارائه می‌دهد و نیز هزینه تولید و زمان به مقدار زیادی کاهش می‌یابد؛ محدودیت فصلی کشت از میان برداشته شده و کیفیت محصول و وسعت کشت می‌تواند کنترل شود. اولین نمونه‌های گزارش شده در سال ۱۹۹۰ از تولید پروتئین نو ترکیب با استفاده از کشت‌های سوسپانسیونی سلول گیاه، سرم آلبومین انسانی نو ترکیب و کلرامفنیکل استیل ترانسفراز بود. امروزه بیش از ۳۰۰ گزارش از تولید پروتئین‌های درمانی بر پایه گیاه (آنتی بادی‌ها، آنتی ژن‌ها، واکسن‌ها، هورمون‌ها، عوامل رشد و پروتئین‌های خون انسان) تحت مراحل مختلف تحقیق و توسعه، وجود دارد.

واژگان کلیدی: بیوراكتور، متابوليت‌هاي ثانويه، گياهان دارويي، سوسپانسیون سلولی، محیط زیست.

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

گیاهان دارویی منبع تمام نشدنی از داروهای زندگی بخش برای اکثر جمعیت جهان محسوب می شوند. بیوراکتورها فرصتی مناسب برای بررسی و هدایت سلول ها، بافت و اندام و یا کل ارگانیسم، بوسیله رشد آن ها در شرایط کشت درون شیشه (اینویترو)، برای بدست آوردن ترکیبات مطلوب را فراهم می کند [۱]. گیاهان بعنوان منبع کربوهیدرات ها، پروتئین ها و چربی ها جهت تغذیه و همچنین سرپناه مورد نیاز انسان ها می باشند. علاوه بر آن، گیاهان منبع ارزشمندی از متابولیت های ثانویه هستند که به عنوان دارو، مواد شیمیایی کشاورزی، طعم دهنده ها، عطرها و خوشبوکننده ها، رنگ ها، افزودنی های غذایی و آفت کش های زیستی استفاده می شوند [۵]. از زمان افزایش جمعیت جهان فشارهای زیادی روی زمین های قابل کشت برای تولید غذا و تأمین احتیاجات وجود دارد. بنابراین به منظور تأمین سایر نیازها، همچون تولید مواد دارویی و شیمیایی از گیاهان، زمین های قابل کشت باید بطور مؤثرتری استفاده شوند. از این رو گسترش تکنیک های مدرن برای بهبود گیاهان، جهت استفاده بهتر از زمین ها به منظور برطرف کردن احتیاجات ضروری است. توسعه و سازگاری کشت سلول گیاهی و روش های کشت اندام، سبب تولید محصولات گیاهی در یک مقیاس وسیع شده است. این مسئله با تلاش و همکاری بیولوژیست های سلولی و مهندسی شیمی در راستای به کارگیری "بیوراکتورها" امکان پذیر شده است. پیشرفت ها در تحقیقات زیست شناسی مولکولی بعد تازه ای 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 نو ترکیب از طریق کشت سوسپانسیون سلول گیاهی چندین مزیت نسبت به سیستم هایی با میزبانی پستانداران و میکروبی ارائه می دهد از جمله: ایمنی ذاتی، زیست پردازشی، و ظرفیت آن ها برای تغییرات پس از ترجمه پروتئین. یکی از موارد مهم کاربرد بیوراکتورها تولید پروتئین های نو ترکیب در کشت های سوسپانسیون سلول گیاهی است که در این مقاله به شرح آن پرداخته می شود [۴].

کشت سلول گیاهی بعنوان منبع تولید متابولیت های ثانویه [۳]

سلول های 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 دامنه ای 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 و کیفی - فراهم آوردن امکان تولید ترکیبات جدیدی مثل پروتئین های نو ترکیب که در گیاه والد یافت نمی شوند - امکان بازیابی و تولید کارآمد و سرعت بالای تولید - فراهم آوردن اطلاعات زیستی در جهت تولید ترکیبات جدید از پیش ماده های ارزان.

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

Adapted from Ravishankar and Ramachandra Rao (2000).

با این همه، هنوز مشکلات زیادی در تولید متابولیت‌ها از طریق کشت بافت سلولی وجود دارد مانند بی‌ثباتی لاین‌های سلولی، عملکرد پایین، رشد آهسته و ... یکی از مهمترین رویکردها برای فائق آمدن بر این مشکلات، استفاده از ریشه‌های گیاهان در کشت 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 رایزوزنز توانایی تحریک ایجاد ریشه‌های موئین در یک محدوده از گیاهان میزبان را دارد که می‌تواند 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 اکسیژن دارند [۵]. چندین عامل در عملکرد متابولیت‌های ثانویه داروها (ترکیبات دارویی) حاصل از کشت ریشه‌های موئین تأثیرگذارند: مواد غذایی، الیسیتورها و تبدیلات زیستی پیش ماده‌ها از این مواردند.

کشت ریشه ناب‌جا [۱]

ریشه‌های گیاهان، مخزن بزرگی از ترکیبات فعال زیستی هستند که شامل تنوع بسیار زیادی از متابولیت‌ها و پروتئین‌های ناب^۱ می‌باشند و بنابراین بعنوان مکانی بی‌نظیر از فعالیت متابولیت‌های تمام گیاه است. اگر سلول‌ها به حالت غیر تمایز یافته باقی بمانند برخی ترکیبات تولید نمی‌شود. با توجه به این واقعیت، کشت ریشه ناب‌جا در سطح بزرگ بیوراکتور بعنوان یک روش جذاب برای تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی و غذاهای اصلی مورد توجه قرار گرفته است. موارد مطالعاتی از کشت ریشه‌های ناب‌جای گیاهان دارویی با استفاده از بیوراکتور به این قرار است: ۱- کشت ریشه‌های

۱ Bona fide

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

کشت بیوراکتور [۴]

قسمت اصلی کنترل بیوراکتور، توانایی زیرنظرگرفتن (مونیتورینگ) تغییرات فرایندهای مهم مانند pH، دما، اکسیژن محلول، نرخ جذب اکسیژن (OUR)، نرخ تولید دی‌اکسیدکربن (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 از کشت اندام، بافت و سلول جهت تولید تجاری مولکول‌های فعال زیستی مهم، میزان عملکرد پایین است. بهینه‌سازی پارامترهای فرآیند، می‌تواند باعث افزایش تولید شود. جهت افزایش تولید، راهکارهایی همچون الیسیتورها، تأمین پیش‌ماده، 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: آنتراگونینون، گینزنوزید، پاکلیتاکسال و دیگر تاکسول‌ها است.

۲. راهبردهای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت 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 تعیین‌کننده‌ای در رشد و تجمع متابولیت‌های ثانویه هستند. از جمله: میزان قند- میزان نیترات- میزان فسفات- تنظیم‌کننده‌های رشد- پیش‌ماده‌های

۱ Morinda citrifolia

۲ Echinacea

۳ Hypericum perforatum

۴ P.ginseng

مجموعه آثار و مقالات برگزیده دهمین کنگره پیشگامان پیشرفت

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

انواع بیوراکتورها [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 متابولیت^۲- آنالیز و مدل سازی دینامیک کشت، شامل هماهنگی بیوسنتز متابولیت و جداسازی آن^۳- 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 ۷ نوع بیوراکتور طراحی و استفاده شده اند [۴]: ۱- بیوراکتورهای تانک همزن: (STR) ۲- بیوراکتورهای استوانه حباب دار: (BCR) ۳- بیوراکتورهای هوا بالابر: (ALR) ۴- بیوراکتورهای غشایی: (MBR) ۵- بیوراکتورهای موج: (WB) ۶- بیوراکتورهای مینیاتور: (MB) ۷- بیوراکتورهای مخزن دوار: (RDR) ۳. مقایسه انواع بیوراکتور هادرکشت سلولی گیاهان و شاخصه های مؤثر در ارزیابی آنها

نوع بیوراکتور	اکسیژن رسانی	تنش هیدرودینامیک	همزدن	حجم 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
هوا بالابر	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 نو ترکیب در کشت های سوسپانسیونی سلول گیاهی [۳]

برخلاف سیستم های گیاه کامل، کشت های سلولی گیاهی تطبیق شده می توانند تحت شرایط کنترل شده در بیوراکتورها برای بدست آوردن عملکرد محصول تجدید پذیر رشد یابند. و همچنین از آنجا که ارگانسیم های نو ترکیب درون تأسیسات

۱ Illumination

۲ Agitation and aeration

۳ Elicitation

۴ Permabilization

۵ Biotransformation

تولید محدود شده‌اند، نگرانی‌های زیست محیطی مربوط به مهاجرت ژن کاهش می‌یابد. یک سیستم کشت سلول گیاه ایده‌آل برای تولید پروتئین نو ترکیب دارای ویژگی‌هایی از جمله :

۱- نرخ رشد ویژه بالا ۲- توانایی بالای بیان پروتئین ۳- فعالیت پایین پروتئولیتیک آندوژن (درون زا) ۵- تولید کم متابولیت‌های ثانویه (مانند فنولیک‌ها و کوئینون‌ها که می‌توانند با آمینواسیدهای پروتئین نو ترکیب واکنش داده و از طریق اکسیداسیون باعث تغییرات فیزیوشیمیایی، ساختار و خصوصیات بیولوژیکی و فرآیندهای تصفیه پیچیده پروتئین شوند). ۶- قابلیت اصلاح بعد از ترجمه ۷- الگوی گلیکوزیلاسیون یکنواخت و صحیح و تا خوردگی 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 بشر آینده کم آبی و خشکسالی و کمبود منابع آب‌های زیرزمینی خواهد بود، که این مسئله کشاورزی و به تبع آن امنیت غذایی بشر را تهدید خواهد کرد. این خطر برای ایران جدی تر خواهد بود؛ چراکه کشور ایران روی نوار خشکی کره زمین قرار گرفته و روز به روز با توجه به تغییر شرایط اقلیمی و نیز عدم استفاده صحیح از منابع آبی موجود روبه کم آبی و فرسایش زمین‌های کشاورزی می‌رود. 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 رو گسترش 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 در متن مقاله به آن اشاره شد.

کشت های سوسپانسیونی ضد عفونی شده آزمایشگاهی سلول‌ها، بافت‌ها یا ارگان‌های گیاهی تحت شرایط کنترل شده محیطی در طول 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 نو ترکیب دارای ارزش تجاری، توجه بسیاری را طی دهه‌های گذشته به خود جلب کرده است. امروزه با پیشرفت این تکنیک و ساخت

بیوراکتورهای مختلف علاوه بر متابولیت‌های موجود در گیاه می‌توان با استفاده از تکنیک‌های نظیر بیوراکتورها اقدام به تولید پروتئین‌های نوترکیب نمود. [۶] امروزه بیش از ۳۰۰ گزارش از تولید پروتئین‌های درمانی بر پایه 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 داواگروساینس در فوریه سال ۲۰۰۶ تولید شد. در حال حاضر، اکثر پروتئین‌های نوترکیب از جمله زیست داروهای بشر با استفاده از سیستم‌های یوکاریوتی سنتی تولید می‌شوند مانند سلول‌های پستانداران (۴۵٪) بخصوص سلول‌های تخمدان موش بزرگ چینی (CHO)، مخمر (۱۵٪) و سلول‌های حشرات و سیستم‌های باکتریایی. تولید محصولات نوترکیب از طریق کشت سوسپانسیون سلول گیاهی چندین مزیت نسبت به سیستم‌های سنتی میزبان پستانداران و میکروبی ارائه می‌دهد. مانند: ایمنی ذاتی (آن‌ها نمی‌توانند ویروس‌ها و پاتوژن‌های پستانداران را انتشار دهند)، زیست پردازش مقرون به صرفه (ارزان بودن مواد شیمیایی تعریف شده محیط کشت) و ظرفیت آن‌ها برای تغییرات پس از ترجمه پروتئین (تولید گلیکوپروتئین‌ها و پروتئین‌های چند واحدی پیچیده، نشان دادن شباهت به هم‌تایان بومی از نظر ساختارهای N گلیکان در مقایسه 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. جلد ۱ و ۲- 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.