کشت ریشه‌های مویین گیاهان دارویی در بیوراکتور مه‌ساز

زهرا عاشوری زاده[۱]، قربانعلی نعمت زاده[۲]، مرتضی خان احمدی [*۳]، کمال کاظمی تبار [۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۲]استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[*۳] دانشیار مدیریت منطقه مرکزی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کشور- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

[۴] دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*نویسنده مسئول: khanahmadi@yahoo.com

چکیده

ریشه‌های مویین گیاهان دارویی تولید شده با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز و یا هورمون‌های مختلف منابع متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی برای استفاده در زمینه‌های مختلف هستند. تولید صنعتی این متابولیت‌ها با استفاده از بیوراکتورها پیشرفت بزرگی در صنایع دارویی محسوب می‌شود. انواع مختلف بیوراکتور برای تولید ریشه‌های مویین در مقیاس‌های آزمایشگاهی و نیمه‌صنعتی مورد استفاده قرارگرفته‌اند. این بیوراکتورها برحسب فاز دربرگیرنده ریشه‌ها به بیوراکتورهای فاز مایع، فاز گاز، و ترکیبی تقسیم می‌شوند که هر یک دارای مزایا و معایب منحصربه‌فرد خود می‌باشند. شناخت سیستم‌های مختلف در بیوراکتورها و به دنبال آن اشراف روی مزایا و معایب هرکدام می‌تواند استفاده از بیوراکتورها را اقتصادی‌تر و با چالش کمتری روبه‌رو سازد. بیوراکتور مه ساز روش جدیدتری برای گسترش ریشه‌های مویین که مزیت آن امکان تولید مقدار بیشتر بیومس در واحد حجم و در عین حال اکسیژن رسانی کافی به بافت گیاهی مورد نظر می‌باشد. در بیوراکتورهای مه ساز می‌توان از فناوری یکبار مصرف استفاده نمود که در این صورت سرمایه و مدت‌زمان ساخت کاهش می‌یابد. هدف از این مطالعه شناخت بیشتر بیوراکتور مه ساز جهت کشت وسیع ریشه‌های مویین و آشنایی بیشتر مزایا و معایب آن می‌باشد.

کلمات کلیدی: **ریشه‌های مویین، اگروباکتریوم رایزوژنز، متابولیت‌های ثانویه، صنعتی شدن، بیوراکتور مه ساز**

مقدمه

امروزه متابولیت‌های استخراج شده از گیاهان در صنایع مختلف دارویی، آرایشی و بهداشتی، تغذیه، مکمل‌های غذایی و آفت‌کش‌ها تجاری شده‌اند. هنوز منابع بسیاری از گیاهان از نظر فعالیت‌های بیولوژیکی و تجاری کشف نشده‌اند و نیاز به مطالعات و بررسی‌های بیشتری در این گونه موارد وجود دارد. با پیشرفت در بیوتکنولوژی به‌ویژه در حوزه کشت بافت و گسترش روش‌های نوین برای تولید تجاری منابع ارزشمند گیاهان، روزبه‌روز شاهد توسعه‌ی بیشتر فناوری‌های مرتبط در این زمینه هستیم. با توجه به اینکه معمولاً ریشه‌های گیاه پتانسیل تولید و تجمع ترکیبات فعال بیولوژیکی و رشد در محیط کشت را دارند، لذا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (Tescione et al., 1997). در دو دهه‌ی گذشته ریشه‌های مویین در گیاهان دارویی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی ارزشمند و برخی ترکیبات دیگر بسیار مورد توجه قرارگرفته‌اند. پروتئین‌ها نیز به‌صورت نوترکیب جهت استفاده دارویی در گیاهان تولیدشده‌اند. همچنین جهت گیاه‌پالایی نیز از ریشه‌های مویین استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال ریشه مویین جعفری فرانسوی جهت رنگ‌زدایی (Patil et al.,2009) و از ریشه‌های مویین تنباکو جهت تولید آنزیم‌های پراکسیداز برای حذف فنل (Alderete et al., 2009) و از ریشه‌های مویین کلزا جهت حذف دی کلرو فنل از محلول‌ها (Angelini et al., 2011; weathers et al., 2008; Guillon et al., 2006; Stiles and Liu, 2013) استفاده شده است. همچنین ریشه‌های مویین

قادر به تولید ترکیبات جدیدی هستند که در ریشه‌های غیر تراریخته وجود ندارند مانند ریشه‌های مویین تراریخته ی *Scutellaria baicalensis* که به‌جای مشتقات گلوکز، فلاونوییدهای گلوکوزیدی تولید کرده‌اند (Hu and Du, 2006). این نوع ریشه‌ها از نظر ژنتیکی تغییر یافته بوده و از طریق اگروباکتریوم رایزوژنز القا می‌شوند. از مزایای ریشه‌های موئین می‌توان به سریع الرشد بودن این نوع ریشه‌ها بدون نیاز به هورمون‌های گیاهی، ثبات بالا از نظر ژنتیکی و بیوسنتزی و همچنین نگهداری آسان اشاره نمود (حسین خوانی، ۱۳۹۴، احمدی و معینی، ۱۳۹۳).

تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس صنعتی با استفاده از ریشه‌های مویین نیازمند کشت وسیع در بیوراکتورها می‌باشد (Kim et al., 2001). کشت ارگانیزم‌های زنده در بیوراکتور با هدف تکثیر سریع، شناسایی مکانیزم‌های حاکم بر آن‌ها و یا تولید ترکیبات پرارزش و یا حذف ترکیبات مزاحم انجام می‌گیرد. با توجه به تعریف Martin و همکاران بیوراکتور به‌عنوان "دستگاهی جهت کنترل فرآیندهای بیولوژیکی و بیوشیمیایی که دارای نظارت دقیق و کنترل شدید محیط و شرایط موجود از قبیل PH، دما، فشار، مواد مغذی و حذف مواد زائد" تعریف می‌گردد (Martin and Vermette, 2005). مزیت اصلی بیوراکتورها کنترل و بهینه‌سازی شرایط فیزیکی و شیمیایی ست اما در برخی موارد هزینه‌های زیاد و گاها ترکیبات سمی که از آلودگی‌های قارچی مختلف ایجاد می‌شود، استفاده از این دستگاه را محدود می‌کنند (Deziel et al., 1999). بیوراکتورها از نظر محیط دربرگیرنده اندام در حال رشد به سه دسته بیوراکتورهای فاز مایع، فاز گازی یا هیبرید که ترکیبی از دو نوع قبلی است تقسیم می‌شوند. همچنین از لحاظ ساختار اندام در حال رشد بیوراکتورها به دو دسته بیوراکتورهایی سوسپانسیون‌های سلولی و بیوراکتورهای کشت بافت تقسیم می‌شوند. برخی از بیوراکتورها برای چند حالت مختلف قابل استفاده هستند. طراحی بیوراکتور برای کشت ریشه‌های مویین باید با توجه به ویژگی‌های مورفولوژیکی بافت مورد نظر از جمله حساسیت برشی بافت و تقاضای بالای اکسیژن نوک ریشه‌های در حال رشد، انجام گیرد (Towler et al., 2006). بیوراکتورهایی که در فاز گازی هستند، ریشه‌ها متناوباً در معرض هوا یا مخلوط گازهای دیگر و مواد غذایی قرار می‌گیرند (Kim et al.,2001). بیوراکتور مه ساز یکی از انواع بیوراکتورها در فاز گازی است و مزایای برتری نسبت به سایر انواع آن دارد، این نوع بیوراکتور محدودیت‌های تبادل گازی و تنش برشی که به‌طور معمول در بیوراکتورهای حالت مایع وجود دارد را کاهش می‌دهد و علاوه بر آن می‌توان آن را با هزینه کم طراحی و اجرا نمود (Towler et al, 2006؛ احمدی و معینی، ۱۳۹۳). در مطالعه حاضر به توسعه بیوراکتورهای مه ساز برای ریشه مویین گیاهان مختلف پرداخته و مزایا و معایب آن را بررسی خواهد کرد.

ساختار بیوراکتورهای فاز گازی

برای کشت ریشه‌های مویین دو نوع بیوراکتور اصلی وجود دارد که عبارت‌اند از بیوراکتورهای فاز گاز و فاز مایع. بیوراکتورهای فاز گازی بیوراکتورهای بستر چکنده[1] (Taya et al. 1989; Kim et al, 2002) پاششی[2] (Williams and Doran, 2000) و مه ساز[3] را دربر می‌گیرند. اولین مورد بیوراکتورهای گازی توسط کارتر در سال ۱۹۴۲ برای گیاه آناناس ابداع گردید و سپس در موارد پژوهشی و تولیدی متعدد مورد استفاده قرار گرفت. در این نوع بیوراکتورها مواد غذایی از طریق قطرات ریز که بسته به نوع بیوراکتور اندازه‌های متفاوتی دارند، به ریشه‌ها منتقل می‌شوند.کشت‌های درون شیشه‌ای نشان داده‌اند که ریشه‌ها توانایی استفاده از مواد غذایی اضافه که توسط مه پاشی طولانی‌تر بوجود می‌آید را برای تولید بیومس بیشتر ندارند، زیرا مواد غذایی که به‌صورت مه هستند به‌سرعت از بین بافت‌های گیاهی عبور می‌کنند و از محیط ریشه‌ها خارج می‌شوند (Woo et al., 1996). بیوراکتورهای فاز گازی مناسب بافت‌ها و اندام‌های گیاهی هستند که ساختار متخلخلی دارند و مایعات در آن‌ها انباشته نمی‌شوند. چون در این حالت گاز

[1]Trickle bed
[2]liquid-dispersed
[3]nutrient mist reactors

می‌تواند همراه با مایع در توده‌ی بیومس جریان یابد. به‌هرحال نشست مناسب محلول غذایی بر ریشه‌ها نکته کلیدی در بیوراکتورهای گازی می‌باشد. اگر نشست زیاد باشد لایه ضخیمی از مایع بر ریشه‌ها نشسته و انتقال گاز را با دشورای مواجه می‌کند (Weathers and Zobel, 1992). نکته مثبت موجود در ارتباط با این بیوراکتورها این است که ریشه‌ها توانایی بیشتری برای جبران توزیع غیریکنواخت مایع در مقایسه با توزیع غیریکنواخت گاز در بیوراکتور دارد(Mckelvey et al., 1993). مزیت دیگر این نوع بیوراکتور، کاهش محدودیت‌های انتقال جرم و استفاده مؤثرتر از فضا می‌باشد همچنین بیوراکتورهای فاز گاز در اغلب موارد باعث تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه و کاهش تنش‌های برشی می‌شوند (weathers et al., 2008). از نکات منفی بیوراکتورهای فاز گاز ضرورت استقرار یکنواخت ریشه اولیه بر روی چهارچوب درون بیوراکتور است که به نیروی کار زیادی نیاز دارد. برای رفع این معضل بیوراکتور ابتدا به‌صورت غوطه‌ور عمل کرده و پس از استقرار ریشه‌ها و رشد مناسب آن‌ها محیط کشت داخل بیوراکتور تخلیه شده و بیوراکتور به‌صورت پاششی یا مه پاش عمل خواهد کرد که این نوع کارکرد بیوراکتور اصطلاحاً ترکیبی نامیده می‌شود (Stiles and Liu., 2013).

ساختار بیوراکتور مه ساز

بیوراکتور مه ساز می‌تواند هم برای سلول‌های گیاهی و هم سلول‌های حیوانی استفاده شود (Chatterjee, 1997). اولین بار Weatheres و Giles در سال ۱۹۸۸ از بیوراکتور مه ساز (NMR) برای کشت سلول‌های گیاهی استفاده کردند (Wheatheres and Zobel, 1992). در سال‌های اخیر این نوع بیوراکتور برای کشت ریشه‌های مویین کاربرد زیادی پیدا کرده است. بیوراکتور مه ساز نوعی راکتور می‌باشد که در آن فاز مایع به ذرات مایع بسیار ریز تبدیل می‌شود. این تبدیل را می‌توان از طریق دیسک چرخان، دستگاه اسپری کننده گاز فشرده یا یک ژنراتور التراسونیک برای تولید ذرات مه ایجاد کرد. التراسونیک بدون نیاز به فشار زیاد ذرات بسیار ریزی تولید می‌کند و مؤثرترین روش برای ایجاد آئروسل محسوب می‌شود. بیوراکتور مه ساز مجهز به التراسونیک برای تولید مه توسط فاکس (۱۹۸۸) معرفی شد و در رشد سرخس‌ها، نهال‌های موز و هویج موفقیت زیادی به همراه داشت. در ریزازدیای به این روش احتیاجی به تماس دائمی محلول غذایی جامد و یا مایع نمی‌باشد بلکه گیاه مورد نظر به‌صورت مداوم و یا متناوب با استفاده از چرخه مه سازی از مواد مغذی و گاز موجود جهت رشد خود استفاده می‌کند (Weatheres and Giles, 1988). قطر ذرات مه در این نوع بیوراکتور یکی از عوامل تأثیرگذار در تولید محصول موردنظر می‌باشد چراکه ذرات مه به دلیل نسبت سطح به حجم زیاد، اکسیژن زیادی جذب کرده و آن را به گیاه منتقل می‌کنند و می‌تواند دلیلی برای سرعت رشد بیشتر بیومس در این بیوراکتورها باشد. ذرات ریزتر زمان ته‌نشینی بیشتر، امکان نفوذ زیادتر در داخل بسترهای فشرده و تبادل گاز بهتری دارند ولی ریز بودن بیش از حد ذرات می‌تواند به رسیدن مقدار کمتر محیط کشت به ریشه منجر گردد. برای ریشه‌های مویین قطر بهینه ذرات به‌خوبی بررسی نشده ولی قطر ۱ میلی‌متر به‌عنوان حداقل قطر مناسب پیشنهاد شده است (Weathers et al., 2008). در بیوراکتورهای مه ساز بیومس می‌تواند ۳۷ درصد از حجم بیوراکتور را قبل از شروع محدودیت اکسیژن اشغال کند، این مقدار در بیوراکتورهای فاز مایع ۶ درصد می‌باشد (Stiles and Liu, 2013). از دیگر پارامترهای قابل تنظیم در این بیوراکتورها علاوه بر قطر ذرات مه، شدت و دوره تناوب مه پاشی می‌باشند (Weathers et al., 2008).

راکتورهای مه پاش به دو صورت بچ (بسته) یا پیوسته عمل می‌کنند (Lehmann et al., 2014). در سیستم بچ خوراک پاشش شده در پایین بیوراکتور جمع‌آوری شده و به مخزن برگشت داده می‌شود. در سیستم پیوسته خوراک جمع‌آوری شده دور ریخته می‌شود. برخلاف انتظار اغلب ریشه‌ها سیستم بچ را ترجیح می‌دهند زیرا به‌تدریج توزیع مواد غذایی و pH بهبود یافته و ترکیبات تحریک کننده رشد شامل اولیگوساکاریدها، پپتیدها، و اکسین ها (Weathers et al., 2005) از گیاه به داخل محیط کشت تراوش می‌یابند و محیط کشت پس از دو هفته رسیده می‌شود. محیط کشت رسیده با فیلتر استریل شده و به داخل مخزن ذخیره محیط کشت فرستاده می‌شود. در طی اتوکلاو کردن محیط

کشت بخشی از ساکاروز به فرکتوز و گلوکز تجزیه شده و مقادیر کمی محصولات جانبی سمی تولید می‌شود و در واقع محیط کشت دارای ترکیب ناشناخته‌ای خواهد بود. این تغییرات باعث انحراف در رشد ریشه مویین و تولید متابولیت های ثانویه می‌شود. استفاده از محیط کشت استریل شده با فیلتر این مشکلات را رفع می‌کند (Weathers et al., 2008). بیوراکتور مه ساز بهره‌برداری آسان‌تر و هزینه عملیاتی کمتری را در برمی‌گیرد. هزینه این بیوراکتور به موارد مختلفی از جمله اندازه و نوع قطرات (غبار، اسپری و مه) بستگی دارد (Fatehah, 2015). از مزیت‌های این بیوراکتور تنش برشی کمتر، اکسیژن رسانی آسان‌تر، مصرف کم قند و استفاده زیاد از فضا، همچنین تنظیم دلخواه نسبت دی‌اکسید کربن به اکسیژن را می‌توان نام برد. اشکالات این بیوراکتور شامل تلفات اصطکاکی و توزیع غیر یکنواخت مه می‌باشد (Suresh et al., 2005). مقایسه رشد یک ریشه مویین در بیوراکتور حبابی با بیوراکتور مه پاش نشان داده که در دانسیته‌های کم ریشه، سرعت رشد در بیوراکتور مه پاش کمتر از بیوراکتور حبابی بوده و در دانسیته های زیاد ریشه وضعیت برعکس است. زیرا در حالت اول ریشه‌ها به اندازه کافی ذرات مایع را جذب نمی‌کنند (Wyslouzil et al., 1997).

دو نوع بیوراکتور مه ساز مناسب برای کشت ارگان‌های گیاهی وجود دارد که یکی از این دو به‌وسیله گروه Pamela Weathers ساخته شده و بین ۱ تا ۲۰ لیتر ظرفیت دارد. دیگری بیوراکتور ۶۰ لیتری است که توسط کمپانی ROOTec ساخته شده است (Simonetti et al., 2015). هر دو بیوراکتور بر مبنای کیسه‌های یکبار مصرف هستند که در آن‌ها یک توری امکان تثبیت سلول‌ها و رشد آن‌ها را فراهم می‌آورد. در بیوراکتور اول از نازل التراسونیک برای تبدیل محیط کشت به ذرات ریز استفاده می‌شود درحالی‌که در بیوراکتور دوم از سیستم توزیع پنوماتیک یا همزدن مکانیکی استفاده شده است. این بیوراکتورها در هر دو وضعیت بچ (بسته) و پیوسته کار می‌کنند. مقایسه تولید آرتمیزیسین با کشت ریشه مویین *Artemesia annua* در بیوراکتور مه پاش به متابولیت بیشتر و در راکتور حبابی به بیومس بیشتر انجامیده است (Kim et al., 2002). کشت ریشه‌های مویین *Tagets patula* در بیوراکتور مه پاش بیشترین سرعت تولید بیومس، سرعت رشد، و سرعت تولید متابولیت را در مقایسه با بیوراکتورهای حبابی و بستر چکنده داشته است (Suresh et al., 2005). کشت ریشه‌های مویین *Azadirachta indica* در بیوراکتورهای همزن دار، حبابی، مه پاش و پاششی مقایسه شده که مه پاش بهترین نتیجه را به دنبال داشته است (Sirivastava K and Sirivastava A, 2012).

نوع سازه در سیستم بیوراکتور نقش تعیین‌کننده‌ای در کاهش یا افزایش قیمت آن دارد. در حال حاضر استفاده از بیوراکتورهایی که در سیستم آن‌ها از وسایل و ظروف یکبار مصرف استفاده می‌شود رو به توسعه است و می‌تواند به‌عنوان نسل جدید و کم‌هزینه‌تر بیوراکتورها معرفی شوند. مزایای استفاده از وسایل و ظروف یکبار مصرف کم‌هزینه بودن و پایین بودن سرمایه اولیه است به‌طوری‌که سرمایه ثابت مورد نیاز برای تولید یک محصول با استفاده از سیستم یکبار مصرف با در نظر گرفتن هزینه‌های ارزیابی کلینیکی معمولاً یک‌دهم تولید همین محصول با کمک سیستم‌های مرسوم فولاد ضدزنگ است. از طرفی تجهیزات یکبار مصرف از قبیل کیسه‌ها و فیلترهای استریل آماده مصرف هستند و نیازی به شستشوی قبل و بعد از فرایند نداشته و هزینه انرژی و نیروی کار کاهش می‌یابد (Lee et al., 2011). از دیگر مزایای سیستم‌های یکبار مصرف سرعت نصب و راه‌اندازی آن‌هاست. در برخی موارد ساخت یک واحد تولید داروهای بیولوژیک بر مبنای فولاد ضدزنگ ۵ تا ۸ سال طول می‌کشد. بنابراین ساخت واحد تولیدی باید همزمان با اولین مراحل تحقیقاتی یک دارو آغاز شود که با توجه به بازار پر رقابت و نیز احتمال موفقیت‌آمیز نبودن نتایج تحقیقات سرمایه‌گذاری پرخطری خواهد بود. این درحالی است که استفاده از سیستم‌های یکبار مصرف این زمان را بسیار کاهش داده و خطرات سرمایه‌گذاری را کاهش می‌دهد مضاف بر اینکه حجم سرمایه‌گذاری نیز کاهش می‌یابد (Luitjens and Pralong, 2010). یکی از محدودیت‌های بیوراکتورهای یکبار مصرف در مقایسه با بیوراکتورهای مرسوم

حداکثر حجم آن‌هاست که در حال حاضر ۲۰۰۰ لیتر است ولی اگر به ۱۰۰۰۰ لیتر افزایش یابد می‌توان از پتانسیل‌های سیستم‌های یکبار مصرف نهایت استفاده را داشت (Lee et al., 2011).

نتیجه‌گیری

یکی از دلایل استفاده از بیوراکتورها، استفاده از یک جایگزین مناسب برای استخراج مستقیم مواد باارزش از گیاه به‌منظور به حداقل رساندن ناهمسانی در ترکیب استخراج شده در عین حفظ پتانسیل بیوسنتز آن‌ها می‌باشد. از این رو هیچ یک از این بیوراکتورها برای تمام انواع گیاهان قابل استفاده نیست، انتخاب بیوراکتور مناسب به‌شدت وابسته به نوع گیاه و هدف از انجام آزمایش مورد نظر می‌باشد (Kim et al, 1991). بیوراکتورهای فاز گازی ازجمله نوع مه پاش مزایای قابل توجهی برای کشت ریشه‌های مویین دارند. اکسیژن کافی، سرعت رشد بالا، تولید محصول با عملکرد بالا از جمله این مزایا است. با توجه به اینکه این نوع بیوراکتورها قدمت کمتری نسبت به سایر بیوراکتورها دارند با چالش‌های بیشتری روبه‌رو هستند، به‌طور مثال روش مؤثر مبارزه با آلودگی و یا مورفولوژی مناسب برای بهترین رشد ریشه در بیوراکتور مه ساز روشن نیست. پاسخ به این سؤالات می‌تواند چالش‌های موجود در روند کار را کمتر کند. با وجود اینکه فراورده ممکن است ارزش بالایی داشته باشد اما علاوه بر داشتن اطلاعات کافی در زمینه استفاده از بیوراکتورها، باید نکاتی از قبیل کمترین اتلاف انرژی و هزینه‌های فنی ساخت را نیز در نظر گرفت. تولید صنعتی پایدارتر، کلید توسعه نوآورانه و جدید در زمینه زیست‌فناوری در مقیاس صنعتی می‌باشد.

منابع

Ahmadi, F., Moieni, A. 2014. Hairy roots of medical plants in bioreactors for production of secondary metabolites. Second National Conference on Medicinal Plants and sustainable agriculture (in Persian).

Alderete LGS, Talano MA, Ibáñez SG, Purro S, Agostini E, Milrad SR, Medina MI .2009. Establishment of transgenic tobacco hairy roots expressing basic peroxidises and its application for phenol removal. J Biotechnol 139(4):273–279.

Angelini VA, Orejas J, Medina MI, Agostini E .2011. Scale up of 2,4-dichlorophenol removal from aqueous solutions using Brassica napus hairy roots. J Hazard Mater 185(1):269–274.

Buer, C. S., Correll, M. J., Smith, T. C., Towler, M. J., Weathers, P. J., Nadler, M., ... & Walcerz, D. 1996. Development of a nontoxic acoustic window nutrient-mist bioreactor and relevant growth data. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 32(4), 299-304.

Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). Biochemistry and molecular biology of plants, 24, 1250-1319.

Deziel, E., Comeau, Y., & Villemur, R. 1999. Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds. Biodegradation, 10(3), 219–233.

Fatehah, S. 2015. https://prezi.com/g-jbvuzmhpeh/mist-bioreactor/

Guillon S, Trémouillaux?Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P .2006. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. Trends in Biotechnol 24:403?409

Hosseinkhani, S. 2015. Production of secondary metabolites by in vitro root cultures. the second international conference on sustainable development, strategies and challenges with a focus on agriculture, natural resources, environment and tourism, Tabriz, Permanent Secretariat of the Conference national sustainable development strategies and challenges (in Persian).

Hu, Z., & Du, M. 2006. Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering, 48(2), 121–127.

Kim, D. Il, Cho, G. H., Pedersen, H., & Chin, C. K. 1991. A hybrid bioreactor for high density cultivation of plant cell suspensions. Applied Microbiology and Biotechnology, 34(6), 726–729.

Kim, Y. J., Weathers, P. J., & Wyslouzil, B. E. 2002. Growth of Artemisia annua hairy roots in liquid- and gas-phase reactors. Biotechnology and Bioengineering, 80(4), 454–464.

Kim, Y., Wyslouzil, B. E., & Weathers, P. J. 2001. A comparative study of mist and bubble column reactors in the in vitro production of artemisinin. Plant Cell Reports, 20(5), 451–455.

Lee, B., Langer, E., & Zheng, R. 2011. Next-Generation Single-Use Bioreactor Technology and the Future of Biomanufacturing: A Summary from the Manufacturer's and User's Perspective. Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture, 183-195.

Lehmann, N., Dittler, I., Lämsä, M., Ritala, A., Rischer, H., Eibl, D., ... & Eibl, R. 2014. Disposable bioreactors for cultivation of plant cell cultures. In Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology (pp. 17-46). Springer Netherlands.

Luitjens, A., & Pralong, A. 2010. Going fully disposable—current possibilities: a case study from Crucell. Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture, 341-349.

Martin, Y., & Vermette, P. 2005. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. Biomaterials, 26(35), 7481–7503.

McKelvey, S. A., Gehrig, J. A., Hollar, K. A., & Curtis, W. R. 1993. Growth of plant root cultures in liquid-and gas dispersed reactor environments. Biotechnology progress, 9(3), 317-322.

Patil P, Desai N, Govindwar S, Jadhav JP, Bapat V .2009. Degradation analysis of reactive red 198 by hairy roots of Tagetes patula L. (Marigold). Planta 230(4):725–735.

Simonetti, G., Tocci, N., Valletta, A., Brasili, E., D'Auria, F. D., Idoux, A., & Pasqua, G. 2015. In vitro antifungal activity of extracts obtained from Hypericum perforatum adventitious roots cultured in a mist bioreactor against planktonic cells and biofilm of Malassezia furfur. Natural Product Research. Taylor & Francis. https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1028059

Srivastava S, Srivastava AK .2012. Azadirachtin production by hairy root cultivation of Azadirachta indica in a modified stirred tank reactor. Bioprocess Biosystems Engineering 35(9):1549–1553

Stiles, A. R., & Liu, C. Z. 2013. Hairy root culture: bioreactor design and process intensification. In Biotechnology of Hairy Root Systems (pp. 91-114). Springer Berlin Heidelberg.

Suresh, B., Bais, H. P., Raghavarao, K. S. M. S., Ravishankar, G. A., & Ghildyal, N. P. 2005. Comparative evaluation of bioreactor design using Tagetes patula L. hairy roots as a model system. Process Biochemistry, 40(5), 1509–1515.

Taya, M., Yoyama, A., Kondo, O., Kobayashi, T., & Matsui, C. 1989. Growth characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors. Journal of chemical engineering of Japan, 22(1), 84-89.

Tescione, L. D., Ramakrishnan, D., & Curtis, W. R. 1997. The role of liquid mixing and gas-phase dispersion in a submerged, sparged root reactor. Enzyme and microbial technology, 20(3), 207-213.

Towler, M., Kim, Y., & Wyslouzil, B. 2006. Design, development, and applications of mist bioreactors for micropropagation and hairy root culture. Plant Tissue Culture …, 119–134. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-3694-9_7

Weathers, P. J., & Zobel, R. W. 1992. Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells. Biotechnology Advances, 10(1), 93–115.

Weathers, P. J., Bunk, G., & McCoy, M. C. 2005. The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in Artemisia annua hairy roots. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 41(February), 47–53.

Weathers, P., Liu, C., Towler, M., & Wyslouzil, B. 2008. Mist reactors : principles , comparison of various systems , and case studies. Electronic Journal of Integrative Biosciences, 3(October), 29–37.

Williams, G. R., & Doran, P. M. 2000. Hairy Root Culture in a Liquid-Dispersed Bioreactor: Characterization of Spatial Heterogeneity. *Biotechnology progress*, *16*(3), 391-401.Wilson, P. D. (1997). The Pilot-Scale Cultivation of 16 Transformed Roots. Hairy Roots, 179.

Woo, S. H., Park, J. M., & Yang, J. W. 1996. Root culture using a mist culture system and estimation of scale-up feasibility. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 65(4), 355–362.

Wyslouzil, B. E., Whipple, M., Chatterjee, C., Walcerz, D. B., Weathers, P. J., & Hart, D. P. 1997. Mist deposition onto hairy root cultures: Aerosol modeling and experiments. Biotechnology Progress, 13(2), 185–194.

Hairy Roots of Medical Plants in Mist Bioreactor

Zahra Ashourizadeh[1], GhorbanAli Nematzadeh[2], Morteza Khanahmadi*[3], Kamal Kazemitabar[4]

[1] Master student of agricultural biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

[2] Professor of Agricultural Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

[3*] Associate professor of Agriculture Biotechnology Research Institute, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center

[4] Associate professor Agricultural Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Corresponding Author: Khanahmadi@yahoo.com

Abstract

Hairy roots of medicinal plants that are produced through agrobacterium rhyzogenes or various hormones are valuable resources of secondary metabolites for using in various fields. Industrial production of these metabolites through using bioreactor is a great advance in different industries specifically the pharmaceutical industry. Different bioreactors are used for producing the hairy root in the laboratory and pilot scales. There are three types of bioreactors namely liquid, gas and hybrid phase bioreactor, depend on how they maintain the root. Each of them has its advantages and disadvantages. Having knowledge about different systems of bioreactors, their pros and cons facilitate the challenges and economic use of bioreactors. Mist bioreactor is a new approach to cultivate hairy roots which compared to other bioreactors may produce more biomass per bioreactor volume and facilitate oxygen supply to roots. Using disposable will decrease the cost and manufacturing time of mist bioreactors. The aim of this study is to understand the mist bioreactors, its advantages and disadvantages for producing the hairy roots in large scale.

***Keywords*: Hairy roots, Agrobacterium rhyzogenes, Secondary metabolites, Industrialization, Mist bioreactors**