نقش بیوتکنولوژی و تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای در تولید متابولیت‌های ثانویه: چشم انداز و چالش‌ها

محمد حسین میرجلیلی

استادیار گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی.

چکیده

جمعیت جهان تا سال 2020 به حدود 7/5 میلیارد نفر خواهد رسید که این موضوع، چالش بزرگی بویژه برای کشورهای در حال توسعه در جهت حفظ امنیت غذایی و سلامت آن خواهد بود. با توجه به محدودیت زمین‌های زراعی و منابع آب، توجه به روش‌های نوین بیوتکنولوژی در بهره‌برداری موثر و پایدار از عرصه‌های زراعی و تامین نیازهای غذایی و دارویی در بخش کشاورزی و باغبانی بیش از پیش حائز اهمیت می‌باشد. گیاهان، حاوی متابولیت‌های ثانویه بسیار ارزشمندی هستند که به عنوان منابع دارویی (محصولات دارویی)، آفت‌کش و قارچ‌کش های طبیعی (مواد شیمیایی کشاورزی)، رنگ‌ها و طعم‌دهنده‌های طبیعی (مواد غذایی)، اسانس‌ها و خوشبوکننده‌های طبیعی (مواد بهداشتی)، نقش مهمی در همه فرهنگ‌ها داشته و از آنها برای مبارزه با انواع بیماری‌ها و حفظ سلامت استفاده می‌شوند. شناسایی مواد موثره و اهداف مولکولی آنها از طب سنتی می‌تواند موقعیت‌های متعددی را در توسعه علوم دارویی فراهم نماید. امروزه با استفاده از روش‌های نوین بیوتکنولوژی از جمله تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای، انتقال ژن و زراعت مولکولی، گیاهان حاوی متابولیت‌های ثانویه با ارزش به صورت انبوه تکثیر یا از نظر ژنتیکی به منظور افزایش تولید ترکیبات دارویی، دستکاری و بهبود یافته‌اند. اگرچه پیشرفت‌های بسیار چشمگیری در استفاده از کشت‌های درون شیشه‌ای کنترل شده، انتقال ژن و مهندسی متابولیک در تغییر مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه‌ی هدف و برای افزایش تولید آنها حاصل شده است اما چالش‌های زیادی نیز از مرحله انتخاب مواد گیاهی تا ارزیابی هویت ژنتیکی، مسیرهای بیوسنتز متابولیت ثانویه، بهینه سازی شرایط کشت‌های کنترل شده و در نهایت تولید تجاری آنها نیز وجود دارد. این مقاله به پیشرفت‌های اخیر روش‌های بیوتکنولوژی شامل تکنولوژی کشت‌های بافت، اندام و سوسپانسیون سلولی در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش می‌پردازد و در نهایت چشم‌اندازها و چالش‌های آینده و پیش روی این روش‌ها را مورد بحث قرار می‌دهد.

کلمات کلیدی: بیوتکنولوژی، متابولیت‌های ثانویه، کشت درون شیشه، مهندسی متابولیک، زراعت مولکولی

1- مقدمه

انسان از دیرباز فراورده‌های دارویی گیاهان را به عنوان عوامل موثر در التیام دردهای خویش به کار برده است. اما خودِ گیاهان، فرآورده‌های مذکور را در واقع به عنوان متابولیت‌های ثانویه (secondary metabolites) یا ابزار "حفظ بقاء" در جریان سازگاری به اوضاعِ متغیر محیط زیست تولید می‌کنند. در حال حاضر طیف گسترده‌ای از این ترکیبات و با منشاء گیاهی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند که نقش موثری در تامین سلامت بهداشت جهانی ایفا می‌کنند. این ترکیبات مواد شگفت انگیز و متنوعی با وزن مولکولی پایین هستند که گیاهان طی متابولیسم ثانوی تولید می‌کنند و تا کنون صدها نوع از این ترکیبات شناسایی شده‌اند اما فقط تعداد کمی از آنها در گروه متابولیت‌های ثانویه قرار می‌گیرند.

بطور کلی یکسری از واکنش‌های شیمیایی که واسطه آنزیمی دارند، در گیاهان زنده بعنوان متابولیسم شناخته می‌شوند. با هماهنگی واکنش‌های جزئی مسیرهای متابولیکی شکل می‌گیرد که به سنتز مولکول‌هایی مثل قندها، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب، نوکلئوتیدها و پلیمرهای آنها شامل اسیدهای نوکلئیک می‌انجامد. این تولید و تجمع بعنوان متابولیسم اولیه در نظر گرفته می شود و ترکیبات تولید

شده که برای زنده ماندن گیاه ضروری هستند، متابولیت اولیه (primary metabolites) نامیده می‌شوند. علاوه بر این در گیاهان مسیرهای متابولیکی دیگری نیز وجود دارند که نقش محصول این مسیرها برای گیاهان چندان مشخص و بارز نمی باشد و در بقا و حیات آنها لازم و ضروری نیست. به همین علت مسیر متابولیکی آنها را ثانوی و مواد تولید شده از آنها را نیز متابولیت‌های ثانویه می نامند. هرچند مرز مشخصی بین متابولیت‌های اولیه و ثانویه وجود ندارد و بعنوان مثال برخی از اسیدهای آمینه متابولیت‌های ثانویه هستند ولی در سیستم حیاتی گیاهان نقش ضروری ایفا می نمایند در حالیکه گروهی از استرول‌ها بعنوان متابولیت اولیه در نظر گرفته می‌شوند. از آنجائیکه عملکرد بسیاری از ترکیبات با هم همپوشانی دارد، پس ارتباط نزدیکی بین متابولیت‌های اولیه و ثانویه وجود دارد، چون که بسیاری از مولکول‌های کوچکی که بوسیله متابولیسم اولیه تولید می شوند، بعنوان واحد سازنده برای مسیرهای متابولیکی ثانویه ضروری هستند. مسیرهای متابولیکی بخشی از برنامه تکاملی به حساب می آیند، در واقع متابولیسم ثانویه نشانه تمایز سلول است و شکل گیری متابولیت‌های ثانویه نشانه اختصاصی شدن سلول‌هاست. بواسطه واکنش‌های متنوع بیولوژیکی متابولیت‌های ثانویه در بدن انسان، از آنها برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. در سال 1985 از 3500 ساختار شیمیایی کشف شده جدید، 2600 مورد از گیاهان عالی بدست آمدند، علاوه بر این 121 داروی مهم و استراتژیک پزشکی نیز از گیاهان مشتق شده‌اند. در کشورهای درحال توسعه که سنتز داروهای شیمیایی بسیار انبوه است، 25% از داروها دارای منشاء گیاهی می باشند و بازار فروش گیاهان دارویی سالیانه بیش از 3 بیلیون دلار می باشد. علیرغم پیشرفت در سنتز داروهای شیمیایی بواسطه اثرات جانبی و مخرب آنها بر بدن انسان و همچنین پیچیدگی و پرهزینه بودن سنتز بسیاری از ترکیبات ثانویه گیاهی، توجه به منابع طبیعی در تولید آنها بیش از پیش اهمیت دارد. هم اکنون متابولیت‌های ثانویه تاکسول (taxol)، وینکریستین (vincristine)، وینبلاستین (vinblastine)، ویتافرین (withaferine)، بتولینیک اسید (betulinic acid) و پودوفیلوتوکسین (podophyllotoxine) از منابع گیاهی، تامین و به عنوان داروهای استراتژیک در درمان انواع سرطان مصرف می‌شوند.

2-انتخاب یک روش بیوتکنولوژی در تولید متابولیت‌های ثانویه

از آنجائیکه تولید متابولیت‌های ثانویه طی دوره رشد گیاهان به نحو بارزی تحت تاثیر شرایط محیطی قرار گرفته و از روند طولانی برخوردار است، برای تولید سریع و انبوه آنها می توان از روش‌های بیوتکنولوژی و کشت بافت استفاده نمود. بیوتکنولوژی از طریق کشت سلول، بافت یا اندام گیاهان در شرایط درون شیشه ای (*in vitro*) این موقعیت را فراهم می سازد که تولید این متابولیت‌های گیاهی تحت شرایط کنترل شده و در مدت زمان کوتاهتری انجام گیرد. روش‌های متعدد بیوتکنولوژی که در این رابطه مطرح شده است شامل مواردی همچون 1- کشت سلول، بافت و اندام های گیاهی (کشت سلول، شاخساره و ریشه) 2- گیاهان و موجودات تراریخت (مهندسی متابولیک، زراعت مولکولی) 3- ریزازدیادی گیاهان دارویی (گونه های در خطر نابودی، واریته های مطلوب و گیاهان مهندسی شده) و 4- منابع جدید (میکروارگانیسم های دریایی فتوسنتز کننده و جلبک ها) می‌باشد.

2-1- کشت سوسپانسیون سلول، بافت، اندام یا ریشه مویینه (hairy root) گیاهان دارویی

توسعه کاربرد روش‌های کشت سلول و بافت‌های گیاهی همچنین منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی در مقیاس انبوه می شود. کشت سلول، بافت یا اندام گیاهان (شاخساره و ریشه) در شرایط درون شیشه ای می تواند توسط بیولوژیست‌های سلولی و مهندسین شیمی محقق گردد و در نهایت با طراحی بیوراکتورهای صنعتی برای کشت و رشد سلول‌ها، متابولیت‌های ثانویه گیاهان به مقدار انبوه و اقتصادی تولید گردد. پیشرفت در تحقیقات بیولوژی مولکولی جنبه جدیدی را در کشت‌های درون شیشه‌ای ایجاد کرده است بطوریکه با تولید گیاهان مهندسی شده (engineered plants)، میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در آنها به نحو چشمگیری افزایش می یابد. علاوه

بر این موارد، محدودیت منابع آب و عرصه های زراعی برای تولید از یکسو و نیاز روزافزون جامعه جهانی به گیاهان دارویی و داروهای با منشاء طبیعی و فاقد اثرات جانبی از سویی دیگر، ضرورت استفاده از روش‌های نوین بیوتکنولوژی در جهت افزایش کمی و کیفی متابولیت‌های دارویی در گیاهان را نمایان می سازد. کشت بافت‌های تمایزیافته اعم از شاخساره و ریشه در مقایسه با کشت‌های سلول نسبتاً دارای ثبات بیشتری می باشند و میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در آنها کمتر تحت تاثیر شرایط ناگهانی کشت قرار می‌گیرند. در این میان سیستم ریشه در گیاهان عالی معمولاً سرعت رشد کمتری نشان داده و برای برداشت نیز با مشکلات زیادی همراه است. از اینرو روش های جایگزینی برای تولید مواد دارویی با منشاء ریشه مورد نیاز است. یکی از روش های جدید برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، القای ریشه مویینه با استفاده از اگروباکتریومِ مولد ریشه (*Agrobacterium rhizogenes*) و طراحی سیستم کشت ریشه مویینه می‌باشد. سیستم کشت ریشه مویینه برای محدوده وسیعی از تحقیقات مرتبط با تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت های درون شیشه ای اعم از بیوسنتز و بیوترانسفورماسیونِ (biotransformation) متابولیت های ثانویه، باززایی و تولید گیاهان تراریخت، مهندسی ژنتیک و تولید پروتئین های نوترکیب مورد توجه قرار می گیرد. امروزه ریشه‌های مویینه، به عنوان یک سیستم کارآمد برای تولید متابولیت‌های ثانویه معرفی شده است. کشت ریشه‌های مویینه همچنین مزایای متنوعی نسبت به کشت سوسپانسون سلولی دارند که در جدول 1 به آنها اشاره شده است.

جدول 1- مزایای سیستم کشت ریشه مویینه نسبت به کشت سلول

ویژگی	کشت ریشه مویینه	کشت سلول
هوادهی	بالا	پایین
زمان دو برابر شدن	2 تا 7 روز	0/7 تا 14 روز
اندازه	1 تا 10 سانتی متر	40 تا 200 میکرومتر
محیط کشت	ساده و فاقد هورمون	پیچیده و نیازمند به هورمون
تراکم مادّه اولیه کشت	5 تا 10 درصد حجمی به حجمی	5 تا 10 درصد حجمی به
مورفولوژی	ساختار اندام مانند اما بیوماس	مخلوطی از سلول های منفرد
ثبات ژنتیکی	باثبات-اوپلوئید تا پلی پلوئید	بی ثبات-آنیوپلوئید هتروژن
تجمع تولید	شبیه گیاه والد در برخی موارد	اغلب متفاوت و کمتر از گیاه
رها سازی تولید	زیاد	اغلب
حداکثر تراکم بیوماس	30 گرم ماده خشک در لیتر	200 گرم ماده خشک در لیتر
حساسیت برداشت	خیلی حساس	حساس
اداره کشت مداوم	آسان	مشکل و نیازمند به حمایت
جابجایی و انتقال بیوماس	مشکل بدون قابلیت پمپاژ	آسان با قابلیت پمپاژ

2-2- مهندسی متابولیک

در تولید متابولیت‌های ثانویه و پس از مشخص شدن مسیرهای بیوشیمیایی و تنظیم وظایف سلولی با استفاده از دی‌اِناِ نوترکیب (recombinant DNA)، امکان بهبود فعالیت‌های سلولی به وسیله دستورزی آنزیمی برای تولید متابولیت‌های دارویی فراهم می شود. در حال حاضر دستاوردهای زیاد و گوناگونی در مهندسی متابولیک برای متابولیت‌های ثانویه مختلف به دست آمده است. مسیرهای بیوشیمیایی مختلفی با استفاده از ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های مهندسی شده و پروتئین‌های تنظیمی بررسی شده‌اند. در عین حال از تکنیک آنتی‌سنس آرِاِناِ (antisense RNA) نیز برای مسدود کردن مسیرهای بیوشیمیایی در تولید متابولیت‌های ناخواسته و افزایش راندمان تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش استفاده می‌شود. مانع بزرگ در سرعت گرفتن انجام مهندسی متابولیک، اطلاعات اندک از مسیرهای تولید زیستی متابولیت‌های ثانویه و برهم‌کنش آنزیم‌های درگیر در این مسیرها می‌باشد. همچنین تعداد معدودی از ژن‌های

دخیل در مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه شناسایی شده و در دسترس می‌باشند. مهندسی متابولیک ایندول آلکالوئیدها به واسطه اهمیت زیادی که در داروسازی دارند یکی از مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه است که در سطح آنزیم‌های درگیر و مواد واسط مورد مطالعه قرار گرفته است اما در این مسیر هم ژن‌های محدودی مشخص شده‌اند. برای مهندسی متابولیک انواع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، در کنار علم ژنتیک، تسلط و آشنایی به علوم دیگر از جمله فیتوشیمی و تکنیک‌های مربوط به جداسازی، خالص سازی و شناسایی مواد موثره این گیاهان اهمیت فراوانی دارد.

2-3- راهکارهای افزایش متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه ای

با استفاده از کشت‌های سوسپانسیون سلول‌های گیاهی در شرایط درون شیشه ای می‌توان به پیشرفت قابل ملاحظه ای در تحریک تشکیل و همچنین افزایش متابولیت‌های ثانویه دست یافت. راهکارهای مورد بررسی برای افزایش متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت سلول‌های گیاهی در جدول 2 ارائه شده است.

جدول 2- راهکارهای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سوسپانسیون سلولی گیاهان

1- بدست آوردن لاین‌های سلولی کارامد از نظر رشد
2- غربالگری لاین سلولی پررشد برای تولید متابولیت‌های مورد نیاز
3- غیرمتحرک سازی سلول‌ها برای افزایش عملکرد متابولیت‌های خارج سلولی و تسهیل نمودن
4- استفاده از انگیزنده‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در دوره زمانی کوتاه
5- نفوذپذیر کردن سلول‌ها جهت تراوش متابولیت‌ها به محیط کشت و تسهیل در فرایند
6- جذب متابولیت‌ها از محیط کشت برای جلوگیری از بازخورد متابولیت‌ها در تولید آنها
7- افزایش مقیاس کشت‌های سلولی در بیوراکتورهای مناسب

3-چالش‌ها و محدودیت‌های تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سوسپانسیون سلولی

اگر تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه طبیعی به یک بافت خاص به عنوان مثال بافت تمایز یافته ای نظیر مجاری ترشحی یا غده ها محدود باشد، آنگاه تولید ناچیزی در شرایط درون شیشه ای صورت خواهد گرفت، چراکه سلول‌ها در این شرایط غالباً تمایز نیافته هستند. سلول‌ها و کشت‌های سوسپانسیونی، عموماً از ثبات ژنتیکی برخوردار نیستند و اغلب بدلیل وقوع جهش، تولید ترکیبات نسبت به زمان آغاز کشت به حد پایین تری تنزل می یابد. سلول‌های گیاهی در شرایط درون شیشه ای تشکیل توده می دهند. برای ممانعت از تشکیل توده سلولی نیاز به تکان دادن شدید محیط کشت است، اما این امر باعث صدمه دیدن سلول‌ها می شود. آلودگی ها می توانند بطور قابل توجهی فرایند را مختل نمایند. از آنجا که زمان دو برابر شدن سلول باکتریایی کوتاهتر از سلول گیاهی است، اگر آلودگی های باکتریایی رخ می دهد به سرعت در کشت پراکنده می شود. تحقیقات بسیار گسترده‌تری در زمینه بیوراکتورها و طراحی روش‌های مطلوب برای جداسازی فراورده، بایستی صورت گیرد. فقدان دانش کافی از فرایند رشد سلول‌های گیاهی در بیوراکتورها و فرمانتورها مانع توسعه بیشتر آنها شده است. در نظر گرفتن هزینه تولید هر کیلوگرم از محصول نهایی، مهم است. بطوریکه تولید آن بایستی از نظر هزینه مقرون به صرفه باشد.

منابع

Expósito, O., Bonfill, M., Moyano, E., Onrubia, M., Mirjalili, M.H., Cusidó, R.M. and J. Palazon. 2009 Biotechnological production of taxol and related taxoids: Current state amd prospects. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. 9: 109-121

Malik, S., Cusido, R.M., Mirjalili, M.H., Moyano, E., Palazon, J. and M. Bonfill. 2011. Production of the anticancer drug in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. Process Biochemistry. 46: 23-34.

Mirjalili, M.H., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R.M. and J. Palazon. 2009. Steroidal lactones from *Withania somnifera*, an ancient plant for novel medicine. Molecules. 14: 2373-2393.

Mirjalili, M.H., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R.M. and J. Palazon. 2011. Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* squalene synthase gene in *Withania coagulans* hairy root cultures. Biologia Plantarum. 55: 357-360.

Ramachandra Rao, S. and G.A. Ravishankar. 1996. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites, Biotechnology Advances. 20: 101-153.

Vanisree, M. and H.S. Tsay. 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites, International Journal of Applied Science Engineering. 2: 29-48.

The role of Biotechnology and *in vitro* culture techniques for the production of secondary metabolites: prospects and challenges

Mohammad Hossein Mirjalili

Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G. C., Evin, Tehran, Iran

Abstract

World population is forecast to reach 7.5 billion people by 2020 which is posing a serious challenge to crop production, food security and health, particularly in developing countries. Considering the limited resources such as diminishing and deteriorating cultivable land and water supply, modern tools of biotechnology offer a variety of options through which it is possible to match the strides made in crop improvement in agriculture and horticulture. Plants contain many valuable secondary metabolites that are useful as drug sources (pharmaceuticals), natural fungicides and insecticides (agrochemicals), natural food flavorings and coloring agents (nutrition), and natural fragrances and oils (cosmetics), which play an important role in all cultures, and have been indispensable in maintaining health and combating diseases. The identification of active principles and their molecular targets from traditional medicine provides an enormous opportunity for drug development. Plants with specific chemical compositions can be mass propagated, genetically modified and improved for the extraction of bulk active pharmaceuticals using modern biotechnology such as *in vitro* culture techniques, gene transformation and molecular farming. Although there has been significant progress in the use of biotechnology, using tissue cultures, genetic transformation and metabolic engineering to investigate and alter pathways for the biosynthesis of target metabolites, there are many challenges involved in from plant genotype selection, biosynthetic pathway evaluation, optimization of controlled cultures conditions to successful commercial production. This presentation is focused on recent advances in the production of highly valuable natural compounds, using *in vitro* plant cell, tissue and organ cultures technology. Finally, the future prospects and challenges for the biotechnological production of secondary metabolites are also discussed.

Keywords: biotechnology, secondary metabolites, *in vitro* culture, metabolic engineering, molecular farming