مروری بر تکنیک‌های نوین در تولید آلکالوئیدهای تروپانی

اسماعیل دهقان[1]*، محمدتقی عبادی[2]، حسنعلی نقدی‌بادی[3]، فرج‌اله شهریاری[4]، مجید عزیزی[5]، غلامرضا اصغری[6]

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی گرایش گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار پژوهش کشاورزی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، تهران
٤- دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٥- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٦- استاد مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
آدرس مکاتبه: دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی. کدپستی: ۹۱۷۷۹٤۸۹۷۸ تلفن: ۸۷۹٦۸۱۸ (۰۵۱۱) نمابر: ۸۷۸۷٤۳۰ (۰۵۱۱).
پست الکترونیک: es.dehghanshahreza@gmail.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۵ **تاریخ تصویب:** ۸۸/۱۱/۱۷

چکیده

گرایش روزافزون جوامع بشری به استفاده از داروهای دارای منشاء گیاهی سبب افزایش تقاضای مواد موثره گیاهان دارویی شده است. علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه سنتز مصنوعی مواد موثره گیاهی، هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها راه دستیابی به بسیاری از مواد دارویی ارزشمند است. زمینه تحقیقاتی آلکالوئیدها هرچند سابقه کهنی دارد ولی ما هنوز در ابتدای راه شناخت کامل و بهره‌وری بیوتکنولوژیک آن هستیم. تاکنون در حدود ۵۰۰۰ نوع آلکالوئید در ۱۵ درصد از گیاهان متعلق به ۱۵۰ خانواده گیاهی شناخته شده است که در این بین آلکالوئیدهای تروپانی نظیر هیوسیامین، آتروپین و اسکوپولامین دارای کاربرد گسترده‌ای در پزشکی می‌باشند. امروزه تولید صنعتی آلکالوئیدهای تروپانی از طریق تکنیک‌های نوینی همچون کشت سلول و بافت گیاهی، هیبریداسیون سوماتیکی، مهندسی متابولیک، کشت مقیاس وسیع و تجاری‌سازی آن با استفاده از بیورآکتورها توجه زیادی به خود جلب کرده و در این مقاله مروری سعی شده است که نتایج حاصل از استفاده این تکنیک‌ها بررسی شود.

گل‌واژگان: **آلکالوئیدهای تروپانی، بیورآکتورها، کشت ریشه مویین، کشت سلول، مهندسی متابولیک**

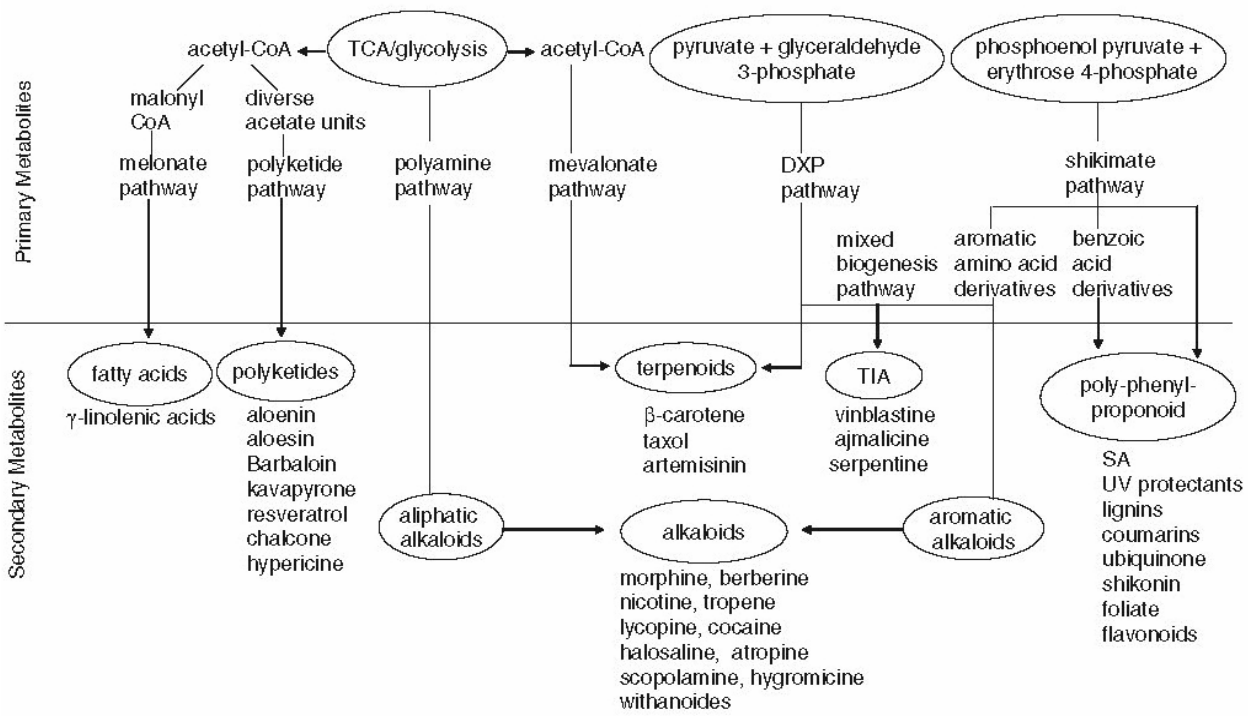
[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

مقدمه

با افزایش مصرف داروهای با منشای گیاهی در جامعه در پی رویکرد جدی جامعه به این دسته از داروها، شرکت‌های داروسازی نیز به طور گسترده به تولید داروها و فرآورده‌های آرایشی - بهداشتی با منشای گیاهی روی آوردند. این مسأله سبب افزایش تقاضای مواد موثره گیاهان دارویی شده است. اگرچه در زمینه تولید مواد موثره گیاهی به روش سنتتیک پیشرفت‌هایی حاصل شده است ولی هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها راه دستیابی به بسیاری از این مواد دارویی ارزشمند است. زیرا مواد موثره گیاهی یا به طور کلی ساختمان شیمیایی ناشناخته‌ای هستند و یا به دلیل برخورداری از ساختمان شیمیایی و یا چرخه‌های تولید بسیار پیچیده (شکل شماره ۱)، تولید آنها به روش سنتتیک در صنایع داروسازی مشکل و مستلزم هزینه بسیار زیاد است [۱،۲،۳].

به هر حال پتانسیل تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی در شرایط طبیعی بسیار محدود می‌باشد و عوامل مختلفی نظیر شرایط اقلیمی و محیطی تولید آنها را با محدودیت مواجه می‌نماید. محققین برای رفع این تنگنا، از تکنیک‌های جدید نظیر کشت سلول و بافت گیاهی، هیبریداسیون سوماتیکی، مهندسی متابولیک و استفاده از بیورآکتورها استفاده می‌نمایند.

آلکالوئیدهای گیاهی یکی از بزرگ‌ترین گروه ترکیبات طبیعی می‌باشند که فرآورده‌های دارویی متنوعی از آنها تولید می‌شود. اگرچه تحقیقات در زمینه آلکالوئیدها، سابقه دیرینه‌ای دارد ولی بشر هنوز در ابتدای مسیر شناخت کامل و بهره‌بری بیوتکنولوژیک این ترکیبات است. بنابراین هرگونه تحقیقات و مطالعات در زمینه شناخت مکانیزم بیوسنتز آنها و شناسایی گونه‌های گیاهی تولیدکننده این مواد بسیار ارزشمند و ضروری است.



شکل شماره ۱- مسیرهای سنتز گروه‌های مختلف متابولیت‌های ثانویه از متابولیت‌های اولیه [٤].

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

تاریخچه و معرفی آلکالوئیدها

اولین بار واژه آلکالوئید به معنی شبه قلیا توسط یک داروشناس آلمانی به نام W. Meibner به کار برده شد. بعدها مشخص شد که خاصیت قلیایی آنها به دلیل حضور یک اتم نیتروژن پایه می‌باشد. اولین آلکالوئید سنتزی، کونین بود که توسط لیدنبرگ در سال ۱۸۸٦ سنتز شد. ارائه یک تعریف دقیق برای آلکالوئید آسان نیست. در ابتدا آلکالوئیدها را به عنوان «ترکیبات گیاهی طبیعی حاوی یک اتم نیتروژن پایه در یک حلقه هتروسیکلیک» تعریف می‌نمودند. بعدها آلکالوئیدها را به عنوان «فرآورده‌های گیاهی با پایه نیتروژن، غالباً از نظر اپتیکی فعال و برخوردار از هتروسیکل‌های نیتروژن به عنوان واحد ساختمانی با یک فعالیت فیزیولوژیکی شناخته شده» تعریف نمودند. پلتیر در سال ۱۹۸۲، این تعریف را برای آلکالوئیدها بکار برد: «یک آلکالوئید، یک ترکیب آلی حلقوی حاوی نیتروژن در حالت اکسیداسیون منفی است که از توزیع محدود در موجودات زنده برخوردار است». اگرچه، آلکالوئید به معنی شبه قلیا است و خاصیت قلیائی یکی از ویژگی‌های مهم این گروه از ترکیبات در نظر گرفته می‌شود، ولی برخی از ترکیبات خنثی نظیر کلشی‌سین که از گیاه گل حسرت[1] استخراج می‌شود و نیتروژن آن در یک گروه آمیدی قرار دارد، به عنوان یک آلکالوئید محسوب می‌شود. پیپرین از فلفل سیاه، بتائین‌ها نظیر استاکیدرین و تریگونلین از دیگر ترکیبات خنثی هستند که در گروه آلکالوئیدها قرار می‌گیرند [٤].

تاکنون حدود ۵۰۰۰ نوع آلکالوئید در ۱۵ درصد از گیاهان متعلق به ۱۵۰ خانواده گیاهی شناخته شده است. بیشتر گونه‌های گیاهی تولیدکننده آلکالوئید از تیره‌های گیاهی Rutaceae، Solanaceae، Apocynaceae، Papaveraceae، Papilionaceae، Ranunculaceae و Rubiaceae می‌باشند. آلکالوئیدهای گیاهی ممکن است به صورت سیستمیک در سراسر گیاه حضور داشته باشند و یا در مقادیر زیاد در اندام‌های خاص مانند ریشه‌ها، پوست ساقه یا بذر تجمع یابند. در نهاندانگان، آلکالوئیدها در دولپه‌ای‌ها بسیار متداول‌تر از تک‌لپه‌ای‌ها می‌باشند. با اینکه آلکالوئیدها را به عنوان محصولات گیاهی در نظر می‌گیرند اما وجود بعضی از این ترکیبات در جانوران و گیاهان پست نیز گزارش شده است. برای نمونه، آلکالوئیدها از پروانه‌ها، جلبک‌ها از جمله جلبک‌های سبز- آبی، قارچ‌ها و باکتری‌ها نیز شناسایی و جداسازی شده‌اند [۵،٦].

گروه‌بندی آلکالوئیدها

آلکالوئیدها از دیدگاه‌های متفاوتی نظیر تاکسونومیکی، داروشناسی و شیمیایی طبقه‌بندی شده‌اند. از آنجا که یک خانواده گیاهی می‌تواند دارای انواع مختلف آلکالوئیدها باشد و یا یک آلکالوئید می‌تواند اثرات دارویی مختلفی را در سیستم‌های مختلف بروز دهد، گروه‌بندی دقیق و مشخص این ترکیبات با مشکل مواجه است. به همین دلیل، امروزه گروه‌بندی بر مبنای ساختمان شیمیایی، بیشتری رایج است.

بر اساس ساختمان شیمیایی، آلکالوئیدها به گروه‌های زیر طبقه‌بندی شده‌اند:

۱- فنیل آلکیل آمین‌ها: این گروه از آلکالوئیدها از فنیل آلانین که یک اسیدآمینه آروماتیک است، ساخته می‌شوند. افدرین، پزودوافدرین، تاکسین و هوردنین در این گروه قرار دارند. آلکالوئیدهای این گروه دارای فعالیت‌های فیزیولوژیکی متنوع می‌باشند.

۲- آلکالوئیدهای تروپانی: آلکالوئیدهای هیوسیامین، آتروپین و اسکوپولامین یا هیوسین، اساساً در گیاهان تیره سولاناسه یافت می‌شوند و از نظر داروشناسی به عنوان ترکیبات آنتی‌کلینرژیک گروه‌بندی می‌شوند. آلکالوئیدهای تروپانی از اسید تروپیک ساخته می‌شوند.

۳- آلکالوئیدهای کینولیزیدینی و پیرولیزیدینی: آلکالوئیدهای کینولیزیدینی در بسیاری از گونه‌های تیره Fabaceae وجود دارند و به طور رایج آلکالوئیدهای لوپینی نامیده می‌شوند زیراکه در تمام گونه‌های جنس *Lupinus* یافت می‌شوند. این گروه از آلکالوئیدها از اسیدآمینه لیزین ساخته می‌شوند. این آلکالوئیدها سبب بی‌اشتهایی در پستانداران، نرم‌تنان و حشرات می‌شوند. آلکالوئیدهای نوع ایزوکینولین از مهم‌ترین آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی هستند. در بین آن‌ها،

[1] *Colchicum autumnale*

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

آلکالوئیدهای خشخاش مانند بنزیل ایزوکینون‌ها (پاپاورین و نکتارین) و فنترین‌ها (مورفین و کدئین) از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند.

٤- آلکالوئیدهای کینولینی: خاصیت ضدمالاریایی این آلکالوئیدها قرن‌هاست که شناخته شده است. کینیدین که آلکالوئید اصلی دیگر این گیاهان است، برای درمان نامنظمی ضربان قلب مورد استفاده قرار می‌گیرد و از خاصیت ضدمالاریا نیز برخوردار است.

٥- آلکالوئیدهای ایندولی: آلکالوئیدهای ایندولی مونوترپنی، یک گروه بزرگ و متنوع از ترکیبات گیاهی هستند که در گونه‌های تیره‌های Loganiaceae، Apocynaceae و Rubiaceae یافت می‌شوند. به طور کلی آلکالوئیدهای ایندولی مونوترپنی از یک واحد تریپتوفان و یک واحد ۹ یا ۱۰ کربنی با منشای ترپنوئیدی، مشتق شده‌اند. تعداد زیادی از آلکالوئیدهای ایندولی در گیاه دارویی پروانش تولید می‌شوند که بعضی از آنها از عوامل ارزشمند در درمان فشار خون و یا در جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی تشخیص داده شده‌اند. وینکریستین، وینبلاستین، آجمالیسین و ویندولین از جمله آلکالوئیدهای این گیاه می‌باشند.

٦- آلکالوئیدهای پورینی: آلکالوئیدهای پورینی از توزیع گسترده‌ای در سلسله گیاهان برخوردارند و حداقل در ۹۰ گونه گیاهی دو لپه از ۳۰ جنس مختلف شناسایی شده‌اند. کافئین و تئوبرومین از آلکالوئیدهای پورینی مهم می‌باشند. آلکالوئیدهای پورینی در چای و قهوه وجود دارند و به طور گسترده در رژیم غذایی روزانه افراد مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۷- آلکالوئیدهای تروپولونی: کلشی‌سین که از فنیل آلانین و از مسیر اسیدهای سینامیک و سیناپیک ساخته می‌شود، در این گروه قرار دارد. این آلکالوئید در پیازهای گیاه گل حسرت و غده‌های گیاه *Gloriosa superba* یافت می‌شود.

۸- آلکالوئیدهای ایزوپرنوئیدی: اگرچه اکثر آلکالوئیدهای گیاهی از منشا آمینی یا اسیدآمینه‌ای برخوردارند، تعداد زیادی از گیاهان حاوی بازهای نیتروژنه فعال بیولوژیکی هستند که از مواد پیش ساز ایزوپرنوئیدی ساخته می‌شوند. این ترکیبات در حقیقت ایزوپرنوئیدهای نیتروژنه هستند، اما از آنجا که این ترکیبات، بسیاری از ملاک‌های تعریف شده برای یک آلکالوئید را دارا می‌باشند، به عنوان آلکالوئیدهای ترپنوئیدی یا استروئیدی از آنها یاد می‌شود [٤،۷].

نقش آلکالوئیدها در گیاهان

فعالیت‌های بیولوژیکی آلکالوئیدها در گیاهان به وضوح شناخته شده نیست، اما واضح است که آنها برای یک فعالیت خاص در گیاهان تولید نمی‌شوند. فعالیت‌ها و یا وظایف زیر برای آلکالوئیدها در گیاهان مختلف مشاهده شده است [٤،٦،۸،۹]:

۱- ترکیبات ذخیره‌ای تامین کننده نیتروژن می‌باشند (در این مورد مستندات اندکی وجود دارد).

۲- مواد سمی هستند که گیاهان را در مقابل حشرات و حیوانات حفظ می‌نمایند.

۳- محرک‌ها یا تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌باشند. برای مثال، آلکالوئیدها رشد جوانه را در چاودار و یولاف محدود می‌نمایند و کلشی‌سین نیز از تقسیم سلولی ممانعت می‌نماید.

٤- منابعی برای ساخت پروتئین هستند.

٥- مواد دفعی گیاهان می‌باشند.

٦- بازدارنده فعالیت‌های آنزیمی هستند.

آلکالوئیدهای تروپانی

همان‌طور که اشاره شد، آلکالوئیدهای تروپانی عمدتاً در گیاهان خانواده بادمجان یا Solanaceae (نظیر داتوره[1]، بذرالبنج[2] و شابیزک[3]) یافت می‌شوند و هیوسیامین، آتروپین، اسکوپولامین و کوکائین معروف‌ترین آلکالوئیدهای تروپانی می‌باشند. مشخصه‌ی تروپان آلکالوئیدها، یک گروه متیل متصل به اتم نیتروژن می‌باشد که این‌چنین ساختمانی در استیل کولین‌های انتقال‌دهنده امواج عصبی در اعصاب مغز نیز دیده می‌شود. خاصیت بیهوش‌کنندگی و مسکن این آلکالوئیدها به همین دلیل می‌باشد [۱۰،۱۱]. آلکالوئیدهای تروپانی کاربردهای

[1] *Datura stramonium*
[2] *Hyoscyamus niger*
[3] *Atropa belladonna*

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

مختلفی در پزشکی دارند که می‌توان به مـواردی ماننـد آرام نمـودن علایم بیماری پارکینسون، گـشادکـردن مردمـک چـشم و افـزایش ضربان قلب، خنثـی کـردن سـستی ماهیچـه‌هـای صـاف ناشـی از ترکیبات فسفره آلی و کاهش ترشح عرق و اسید معده اشاره نمود.

چرخه بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی

به علت اهمیت اقتصادی آلکالوئیدهای تروپانی مطالعـات گسترده‌ای برای کشف مسیرهای بیوسنتزی آنها از سـال ۱۹۵۰ توسـط Edvard leete بـا اسـتفاده از ردیـاب‌هـای ایزوتـوپی صورت گرفته است [۱۲]. کشت‌های ریـشه مـوئین بـه دسـت آمده از تلقـیح *Agrobacterium rhizogenes* بـرای توضـیح مـسیرهای بیوسـنتزی آلکالوئیـدهای تروپـانی بـه وسـیله آزمایش‌های تغذیه ایزوتوپ، به طور گسترده‌ای مـورد اسـتفاده قرار گرفته‌اند. اما علی‌رغم تحقیقات گسترده، مـسیر بیوسـنتزی آلکالوئیـدهای تروپـانی بـه طـور کامـل تـشریح نـشده اسـت. مخصوصاً آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز آنها چندان شناخته شـده نیستند. آلکالوئیدهای تروپانی، دارای یـک حلقـه پیرولیـدین و یک حلقه پیپریدین می‌باشند که اتم نیتروژن و دو اتم کـربن را به اشتراک می‌گذارند. با تزریق اسید آمینه اورنیتین رادیواکتیو به گیاه ملاحظه کرده‌اند که این اسید آمینه بـدون اینکـه وضـعیت فضایی اتم‌های آن تغییر کند، تشکیل حلقه پیرولیدین مولکـول تروپان را می‌دهد. سه اتم کـربن بـاقی‌مانـده از اسـتات مـشتق می‌شود و بدین‌وسیله مولکول پیپریدین تشکیل می‌شود. عمـل متیلاسیون به وسیله انتقـال عامـل متیـل از مولکـول مناسـبی ماننـد متیونین انجام می‌شود و سبب تکمیـل مولکـول تـروپین مـی‌شـود. فنیل‌آلانین نیز پیش‌ساز اسید تروپیک می‌باشد. آزمایش با اسـتفاده از کربن رادیواکتیو نـشان داده اسـت کـه زنجیـر کنـاری اسـید آمینـه فنیل‌آلانین طی این تبدیل، تغییر وضـعیت مولکـولی نیـز مـی‌دهـد. استریفیکاسیون اسید تروپیک با تروپین تولید هیوسـیامین مـی‌کنـد. اسکوپولامین توسط یک سیستم آنزیمی اختصاصی تولید مـی‌شـود که واکنش‌های آن در شکل شماره ۲ نشان داده شده‌اند [۱۱].

کشت سلول

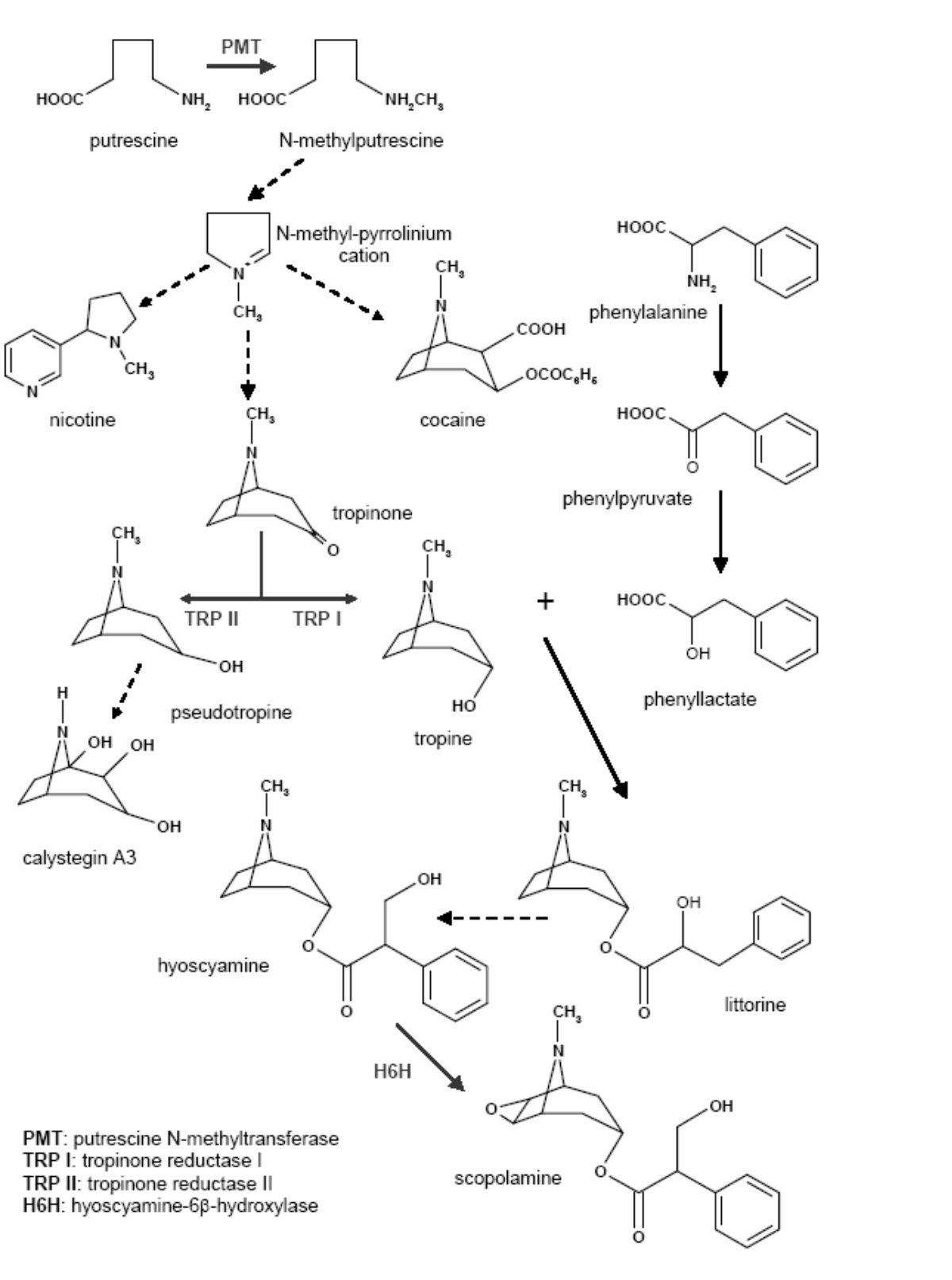
مطالعات در زمینـه تولیـد آلکالوئیـدهای تروپـانی توسـط کشت بافت‌های گیاهی از حدود ۳۰ سال پیش آغاز شد یعنـی هنگامی‌که وِست[1] و همکاران به تولید آلکالوئیـدها در کـالوس *Atropa belladona* پی بردند. کشت سلول گیاهی به عنـوان روشی برای تولید متابولیت‌هـای گیـاهی مزیـت‌هـای متعـددی دارد. کشت‌های سلولی توسط شرایط محیطی محدود نـشده و شرایط اقلیمی و اکولوژیک آنها را متأثر نمی‌نماید. گزارش شده است که میزان تولید بعـضی از متابولیـت‌هـا ماننـد شـیکونین، رزماریک اسید، بربـرین، آنتراکوینـون و آنتوسـیانین در کـشت سلول گیاهی نسبت به گیاهان والد آنها بیشتر می‌باشد [۱۳]. در مـورد تولیـد متابولیـت‌هـای گیـاهی در مقیـاس وسـیع در بیوراکتورها مطالعات زیادی صورت پذیرفته اسـت. ولـی فقـط تولید دو نوع متابولیت شیکونین[2] و تاکـسول بـه حـد تجـاری رسیده است [۱۶]. بـالغ بـر ۲۵ سـال تحقیقـات جهـت تولیـد آلکالوئیدهای مفید با ساختمان شیمیایی متفاوت از طریق کشت سـلولی گیاهـان خـانواده‌هـای متعـدد بـه خـصوص *Datura meteloids*، *Atropa belladonna* و *Hyoscyamus niger* غیره انجـام شـده ولـی هنـوز تولیـد صنعتی آنها میسر نشده است [۱۷]. معمولاً با توجه به تولید کم متابولیت‌ها در کشت سلول گیاهی، تولید این ترکیبات بـا ایـن تکنیک فقط در مـورد متابولیـت‌هـای خیلـی بـا ارزش توجیـه اقتصادی دارد. یکی از موانع اصلی در کاربرد تکنولوژی سـلول فقـدان اطلاعـات کـافی در مـورد مـسیرهای بیوسـنتتیک و مکانیسم‌های کنترل تجمـع متابولیـت‌هـا مـی‌باشـد. از عوامـل محدودکننده دیگر کاربرد این تکنیک می‌توان به سـرعت رشـد کم، ناهمگونی فیزیولوژیک، ناپایـداری ژنتیکـی، محتـوای کـم متابولیت‌ها، ترشح ترکیبات زائد و چسبندگی سـلول‌هـا را نـام برد [۱٤]. هر چند اقدامات زیادی در مورد تولید آلکالوئیدهای تروپانی با استفاده از کشت‌های سوسپانسیون سلولی مخصوصاً در گیاه تاتوره صـورت پذیرفتـه و در مـواردی نیـز بـا کمـک الیسیتورها و سایر استراتژی‌ها موفقیت‌هایی حاصل شده اسـت ولی به طور کلی بـرای ترکیبـات فیتوشـیمیایی مختلفـی ماننـد مـورفین، کـدئین، هیوسـیامین، اسـکوپولامین، وینبلاسـتین و

[1] West

[2] Shikonin

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]



شکل شماره ۲- چرخه بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها [۳۸]

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

وینکریستین نتایج خوبی در کشت سلول دیده نشده است [۷،۱٤].

با توجه به جایگیری اختصاصی بعضی از آنزیم‌های کلیدی مسیر سنتز تروپان آلکالوئیدها و سنتز بیشتر آنها در سلول‌های جوان ریشه و همچنین تولید کم سیستم‌های تمایز نیافته مانند کشت سلول و یا کالوس ضمن ناپایداری ژنتیکی آنها، امروزه عمده تلاش‌ها جهت تولید تروپان آلکالوئیدها مخصوصاً اسکوپولامین در سیستم‌های بیوتکنولوژیک بر ریشه‌های مویین واقع گشته است [۱۵،۱۸،۱۹].

هیبریداسیون سوماتیکی

تکنیک تولید هیبرید از طریق امتزاج پروتوپلاست‌های جداسازی شده در شرایط آزمایشگاهی و سپس رشد و نمو هتروکاریون را هیبریداسیون سوماتیکی گویند. این تکنیک موقعیتی جهت تولید هیبرید بین گیاهانی که از نظر تاکسونومیک دور از هم بوده و امکان تلاقی جنسی بین آنها وجود ندارد، ایجاد می‌کند به نحوی که ما را قادر به تولید گیاهانی با محتوای ژنتیکی هسته‌ای - سیتوپلاسمی جدید می‌نماید [۳۷].

گونه گیاهی *Hyoscyamus muticus* یکی از منابع مهم آلکالوئیدهای تروپانی است، اما به پاتوژن‌های مختلف از جمله شته‌ها و ویروس‌ها حساس بوده که سبب کاهش عملکرد آن می‌شود. از طرفی *H. albus* خصوصیات زراعی مطلوبی داشته که سبب برطرف شدن چنین حساسیت‌هایی می‌شود و از طرفی میزان اسکوپولامین بیشتری در ریشه سنتز می‌کند. هیبریداسیون و به دنبال آن گزینش، ابزاری جدید برای توسعه گیاهانی با قابلیت بیوسنتزی بهتر نسبت به والدین معرفی می‌دارد. با توجه با ناسازگاری جنسی بین این دو گونه، زهرا[1] و همکاران (۱۹۹۸) از هیبریداسیون سوماتیک بین یک موتانت *H. muticus* فاقد کلروفیل و *H. albus* وحشی جهت ایجاد گیاهی هیبرید با خصوصیات برتر استفاده نمودند. آنها گزارش دادند که ریشه‌های مویین هیبرید نه تنها رشد بیشتری داشته بلکه آلکالوئیدهای تروپانی بیشتری نیز نسبت به والدین خود تولید می‌کنند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که ترکیب تکنیک‌های مختلف بیوتکنولوژی مانند هیبریداسیون سوماتیک و ریشه‌های مویین منجر به ایجاد سیستم‌های با قابلیت تولید بالا می‌شود [۲۰].

کشت ریشه‌های مویین

در طی سال‌های اخیر، این تکنیک توسعه یافته است و منبع بالقوه و با ارزشی برای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند [۱۸]. سیستم ریشه‌های مویین بر اساس تلقیح با آگرو باکتریوم رایزوژنز[1] در دو دهه اخیر به عنوان روشی برای تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که در ریشه گیاهان سنتز می‌شوند، رایج شده است [۱۸،۲۱،۲۲]. با توجه به اینکه آلکالوئیدهای تروپانی عمدتاً در ریشه سنتز شده و سپس به اندام‌های هوایی منتقل می‌شوند [۲۳] و عدم کارایی کافی سیستم‌های تمایز نیافته مانند کشت سلول یا کالوس در تولید تروپان آلکالوئیدها [۱۹،۲٤]، همچنین با توجه به جایگیری اختصاصی بعضی از آنزیم‌های کلیدی درگیر در مسیر بیوسنتز این آلکالوئیدها (به عنوان مثال بیان وابسته به پریسکل PMT و جایگیری اختصاصی H6H در پریسکل ریشه)، تلاش برای تولید اسکوپولامین در سیستم‌های بیوتکنولوژیک عمدتاً بر اساس کشت‌های ریشه مویین می‌باشد [۱۵]. از ویژگی‌های ریشه‌های مویین به دست آمده از تلقیح اگروباکتریوم می‌توان به رشد در شرایط عاری از هورمون، فقدان ژئوتروپسیم، انشعابات جانبی زیاد، پایداری ژنتیکی و قابلیت تطابق با طراحی بیوراکتور اشاره نمود. متابولیت‌های ثانویه تولیدی توسط ریشه‌های مویین نه تنها مشابه متابولیت‌های تولید شده در گیاه معمولی بوده، بلکه میزان تولید آن نیز به همان اندازه یا حتی بیشتر از ریشه‌های گیاه طبیعی می‌باشد [۲۵].

در طی فرایند آغشته‌سازی، آگروباکتریوم رایزوژنز ناحیه‌ای از DNA پلاسمید Ri خود به نام T-DNA را به درون ژنوم گیاه منتقل می‌سازد. این T-DNA حامل یک‌سری ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کنترل بیوسنتز اکسین و سیتوکنین است که بر روی شکل ظاهری ریشه موئین تاثیر می‌گذارد.

[1] Zehra

[1] *Agrobactrium rhizogenes*

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

آنکوژن‌های *rolC*، *rolB*، *rolA* و *rolD* از مهم‌ترین این ژن‌ها می‌باشند [۲۶].

هر چند در مورد نقش این ژن‌ها بر روی رشد و مورفولوژی ریشه‌های مویین و گیاهان باززایی شده از آنها اطلاعات تقریباً کاملی موجود می‌باشد ولی تاکنون مطالعات کمی به روی تأثیر مستقیم این اونکوژن‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه انجام شده است. به تازگی مشخص شده است که ژن‌های *rol* نقش فعال‌کنندگی در تولید متابولیت‌های ثانویه در خانواده‌های مختلف از جمله سولاناسه[1] داشته به نحوی که در بعضی موارد، تأثیر فعال‌کنندگی یک تک ژن *rol* برای غلبه بر کمبود تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی کشت شده کافی بوده است [۱۳]. طبق گزارش‌های اخیر بیان ژن *rolC* با تولید آلکالوئیدهای تروپانی همبستگی دارد [۲۷،۲۸]. در مورد استفاده از ریشه‌های مویین جهت تولید متابولیت‌های مختلف، تحقیقات زیادی نشان داده که ثبات ژنتیکی از ویژگی‌های برجسته ریشه‌های مویین بوده که به طور متعدد در آزمایش‌های مختلف به اثبات رسیده است. مطالعات سیتولوژیک انجام شده در چندین گونه نشان داده که تعداد کروموزوم‌های ریشه‌های مویین هیچ تفاوتی با تعداد آن در گیاه والدی نداشته و این ثبات طی نسل‌های متمادی حفظ شده است. این خصوصیت دقیقاً نقطه مقابل وضعیت دیده شده در کشت‌های کالوس و سوسپانسیون سلولی است که به میزان زیادی آنیوپلوئیدی و تغییرات کروموزومی را متحمل می‌شوند [۱۸]. دهقان (۲۰۰۹) موفق به تولید کلون‌های ریشه مویین با ثبات ژنتیکی بالا در بذرالبنج مصری شد. مطالعه فلوسایتومتری این ریشه‌ها حاکی از ثبات بالای این کشت‌ها پس از دو سال واکشت بود [۲۹].

برخی از محققین نشان دادند که ریشه‌های مویین حاصل از توتون، هیبرید *Duboisia* و *Datura metel* قابلیت تولید آلکالوئیدهای مشتق از پوترسین مانند نیکوتین، هیوسیامین و اسکوپولامین را دارا می‌باشند [۲۸،۳۰]. مطالعات انجام شده حاکی از رشد بهتر کشت‌های ریشه مویین بذرالبنج نسبت به کشت ریشه گیاه و توانایی تولید تروپان آلکالوئید به میزان برابر با گیاه مادری در آنها است [۱۷]. ذوالعلی و همکاران پس از القای ریشه‌های مویین در *H. muticus* موفق به تولید کلونی کالوس‌زا با قابلیت تولید اسکوپولامین بالا (۲/۷۲ میلی‌گرم بر گرم)، به نحوی که این میزان برای ریشه‌های مویین این گیاه چشم‌گیر بود، شدند [۳۱]. فارسی و همکاران (۲۰۰۵) پس از القای ریشه‌های مویین در گیاه *Datura stramonium* موفق به تولید ریشه‌های مویین با قابلیت تولید سه برابر بیوماس و میزان آلکالوئیدی برابر با ریشه‌های طبیعی شدند، آنها گزارش نمودند که کشت‌های ریشه تراریخت به دست آمده از قابلیت تولید سه برابر محصول نسبت به ریشه‌های طبیعی برخوردار می‌باشند [۳۲].

با توجه به اینکه در اغلب موارد میزان تولید آلکالوئیدهای تروپانی بسیار کم می‌باشد، به منظور تجاری نمودن استفاده از ریشه‌های مویین، استراتژی‌های مختلفی به کار برده شده است. برخی از این استراتژی‌ها عبارتند از:

۱- گزینش: به طور معمول اولین مرحله در هر تحقیقی جهت تولید ماده‌ای خاص از کشت‌های گیاهی آزمایشگاهی، گزینش لاین‌هایی با تولید بالا می‌باشد. به علت تصادفی بودن مکان الحاق T-DNA در ژنوم گیاه میزبان و میزان بیان متفاوت ژن‌های مربوطه، کلون‌های ریشه مویی مختلف، تنوع رشدی و الگوی تجمع متابولیت‌های متفاوتی را نشان می‌دهند [۳۳]. بنابراین انجام گزینش از میان کلون‌های مختلف ریشه مویین می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد.

۲- بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت و شرایط محیطی: نوردهی کشت‌های گیاهی اغلب منجر به افزایش تجمع ترکیبات ثانویه می‌شود به ویژه هنگامی که این ترکیبات در اندام‌های هوایی گیاهان تولید می‌شوند. هر چند که بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی به ریشه محدود شده است، باز هم گزارش‌هایی مبنی بر اثرات مثبت نوردهی بر کشت‌های ریشه و افزایش این آلکالوئیدها وجود دارد [۳٤].

بسیاری از اجزای محیط کشت از عوامل مهم در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. قندها علاوه بر منبع کربن به عنوان ترکیبات ایجاد سیگنال در تولید آلکالوئیدهای تروپانی در کشت‌های ریشه عمل می‌کنند. هگزوکیناز و کلسیم نیز در

[1] Solanaceae

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

انتقال سیگنال نقش دارند. مسیر سیگنالی قندی با تأثیرات هورمون‌های گیاهی و نور برهم کنش دارد. در حالی که اکسین در حضور ساکارز تأثیر بازدارندگی بر روی ژن *pmt* دارد، در ترکیب با سوربیتول نقش مثبت در تولید آلکالوئیدها دارد [۲٤]. برخی محققین گزارش نمودند که ریشه‌های مویین *H. muticus* در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز حداکثر مقدار تولید هیوسیامین را دارا می‌باشند [۳۵]. در مطالعه صورت گرفته توسط دهقان (۲۰۰۹)، ریشه‌های مویین دیپلوئید وتتراپلوئید *Hyoscyamus muticus* بیشترین میزان تولید بیومس را در محیط کشت B5 در غلظت ٤۰ گرم بر لیتر ساکارز نشان دادند. بیشترین میزان اسکوپولامین تولیدی برای ریشه مویین دیپلوئید رشد یافته در محیط MS حاوی ۵۰ گرم بر لیتر ساکارز به دست آمد [۲۹].

تحقیقات نشان داده اگرچه آمونیم در طول روزهای اولیه کشت ریشه‌های مویین اهمیت زیادی دارد، ولی نیترات در وقایع بعدی مانند بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها موثر است. همچنین آمونیم نقش مؤثری در تولید بیوماس دارد، در حالی‌که نقش نیترات در تجمع آلکالوئید آشکارتر است [۳٦]. در تحقیق دیگری، پاولف[1] و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که تأثیر منبع نیتروژن در تولید آلکالوئیدها بیشتر وابسته به گونه بوده و نقش آن هنوز به طور کامل مشخص نشده است [۳۷]. بنسدک[2] و همکاران (۲۰۰۱) گزارش نمودند که غلظت نیترات و آمونیم در محیط کشت تأثیر زیادی در نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین در ریشه‌های مویین *A. belladona* دارد به نحوی که با افزایش غلظت آنها این نسبت ۲ تا ۳ برابر افزایش می‌یابد [۳٦].

گاُرگیو[3] و همکاران (۲۰۰۷) پس از بررسی هورمون‌های مختلف بر کشت‌های ریشه مویین *H. muticus* گزارش نمودند که کشت‌های ریشه مویین، غلظت‌های ۵ µm – ۰/۰۱ اکسین را در محیط کشت به راحتی تحمل نموده و روی رشد آنها تأثیر چندانی نداشته است. تجمع آلکالوئید در آنها نسبت به ریشه‌های رشد یافته در شرایط عاری از هورمون دو برابر بوده است. سیتوکنین تأثیری بر رشد نداشته اما ABA و GA3 تولید آلکالوئیدها را شدیداً کاهش داده‌اند [۳۳]. به طور کلی مجموع تحقیقاتی که در زمینه بهینه‌سازی شرایط کشت برای ریشه‌های مویین *H. muticus* صورت گرفته است، نشان داده که ریشه‌های مویین مانند کشت‌های سوسپانسیون سلولی به راحتی به تغییر شرایط کشت پاسخ نداده و غلظت بهینه مواد مغذی موردنیاز برای رشد آنها با مقادیر بهینه برای تولید مطلوب آلکالوئید متفاوت است [۳۱].

۳- افزودن الیسیتورها: الیسیتورها در واقع سیگنال‌هایی هستند که سبب تسریع تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی برای تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین به کار برده شده‌اند، که به طور کلی سبب کاهش زمان فرآیند دستیابی به میزان غلظت بالای متابولیت‌ها شده‌اند [۳۸].

فلزات سنگین مانند cu^{2+} الیسیتورهای ایده آلی می‌باشند. افزایش غلظت‌های مس تا ۱۱ µm تولید هیوسیامین در ریشه‌های مویین *H. muticus* را افزایش داد در حالی‌که تأثیری بر سرعت رشد نداشت [۲۲]. در آزمایش‌های دیگری از کیتوسان خالص با غلظت ۵۰۰ – ۵۰ µg/ml در کشت ریشه‌های مویین *H. muticus* استفاده شد و افزایش ۵ برابری غلظت هیوسیامین در کشت‌ها مشاهده‌گردید [۲۵].

٤- اجتناب از تجمع متابولیت های ثانویه: آلکالوئیدها به طور معمول در بخش‌های درون سلولی و معمولاً در واکوئل قرار گرفته‌اند. بنابراین تولید بسیاری از آنها به خاطر ظرفیت متناهی واکوئل محدود شده است. نفوذپذیرکردن سلول‌ها توسط شکل‌گیری منافذ در یک یا چند سیستم غشایی سلول‌های گیاهی، عبور مولکول‌های مختلف به داخل و خارج سلول را فراهم می‌کند. به منظور افزایش آلکالوئیدهای مطلوب و کاهش هزینه‌ها، چندین روش برای تراوش‌پذیرکردن سلول‌ها و آزادسازی متابولیت‌ها به کار رفته است [۱۱]. برای مثال در کشت های ریشه مویین تاتوره، سرفکتانت توین ۲۰، عامل تراوش‌پذیرکننده مؤثری در آزادسازی آلکالوئیدهای تروپانی به محیط کشت بوده است. همچنین حلال‌های آلی

[1] Pavlov
[2] Bensddek
[3] Georgiv

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

مانند ایزوپروپانول[1]، دی متیل سولفوکسید[2]، نمک‌ها و پلی‌ساکاریدهایی مانند کیتوسان به عنوان عامل تراوش‌پذیرکننده به کار رفته‌اند. از سایر روش‌های مربوطه می‌توان اولتراسونیک[3]، الکتروپوراسیون و یونوپورتیک[4] را نام برد [٤].

٥- تغییر سطح پلوئیدی: چشم‌انداز اصلاح تولید متابولیت‌های ثانویه توسط دستورزی سطح پلوئیدی (به موازات گزینش لاین‌هایی با تولید بالا) باید در طول مراحل اولیه فرایند بهینه‌سازی مورد تحقیق و ارزیابی قرار گیرد، با این وجود معمولاً اهمیت این موضوع به طور کامل نادیده گرفته شده یا اینکه توجه کمی به آن شده است [۳۷]. پلی‌پلوئیدی مصنوعی یک تکنیک چاره برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گونه‌های گیاهی مختلف می‌باشد [۳۹]. نیل سریع به افزایش تولید بیومس و اسکوپولامین در بذرالبنج مصری با استفاده از القاء تتراپلوئیدی در مطالعه شهریاری و همکاران (۲۰۰۸) و دهقان (۲۰۰۹) گزارش شده است [۲۹،٤۰]. دستورزی عدد کروموزومی در سیستم‌های In vitro ریشه مویین نیز ممکن است ابزار مؤثری جهت افزایش تولید مواد فعال زیستی و ترکیبات جدیدی باشد که ممکن است در گیاه مادری یافت نشوند [۱۱].

دجسوس گونزالز و ویترز[5] (۲۰۰۳) گزارش نمودند که ریشه‌های موئین تتراپلوئید گونه *Artemisia annua* قادر به تجمع آرتمیزین به میزان ٦۰۰ درصد بیشتر از ریشه‌های موئین دیپلوئید می‌باشند، هر چند کاهش سرعت رشد در کلون‌های تتراپلوئید ریشه موئین دیده شد ولی توانایی تولید متابولیت بیشتری داشتند [٤۱].

برکُف[6] و همکاران (۲۰۰۳) برای اولین بار ریشه‌های مویین پلی‌پلوئید در گیاه دارویی تاتوره ایجاد نمودند و در این مطالعه تغییرات قابل توجهی در طیف آلکالوئیدهای تروپانی گیاه تاتوره تتراپلویید مشاهده شد به نحوی که ریشه‌های مویین تتراپلوئید قادر به تولید استر تروپان‌های جدیدی بودند. ریشه‌های مویین تتراپلوئید به استثنای هیوسیامین و آپوآتروپین سایر آلکالوئیدهای تروپانی را به میزان بیشتری تولید نمودند [٤۲]. دهقان (۲۰۰۹) در تحقیقی مشاهده نمود که ریشه‌های مویین تتراپلوئید بذرالبنج مصری به دست آمده نه تنها از نظر ظاهری درشت‌تر بودند بلکه در مجموع قادر به تولید حدود ۱۵/۳۵ درصد اسکوپولامین بیشتری نسبت به ریشه‌های مویین دیپلوئید بودند [۲۹].

به هرحال، کاهش سرعت رشد به خاطر بزرگ‌تر شدن حجم ژنوم از چالش‌های مهم پیش رو در این زمینه است ولی با انجام گزینش کلون‌های سریع‌الرشد که توانایی تولید تروپان آلکالوئید بیشتر دارند می‌توان تا حدودی بر این مشکل نیز فائق آمد [۲۹]. اگرچه مطالعات زیادی در زمینه بیوسنتز و تجمع آلکالوئیدهای تروپانی در ریشه‌های مویین دیپلوئید صورت پذیرفته است اما در مورد ارتباط اندازه ژنوم (سطح پلوئیدی) با تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین اطلاعات کمی وجود دارد [٤۲].

٦- **مهندسی متابولیک**: از توانایی تغییر DNA ژنومی ریشه‌های مویین به واسطه Ri پلاسمید مهندسی شده آگروباکتریوم، استفاده گسترده‌ای در افزایش متابولیت‌های ثانویه شده است [۳۸]. ترانسفورماسیون به واسطه آگروباکتریوم این مزیت را داراست که با قرار دادن هر ژن خارجی مورد علاقه در یک وکتور دوگانه، بتوان آن را به کلون‌های ریشه مویین تراریخت انتقال داد [٤۳].

به طور کلی استراتژی‌های مختلفی در مهندسی متابولیک برای بهبود تولید به کار برده می‌شود [٤٤] که برخی از آنها عبارتند از:

- افزایش تعداد سلول‌های تولیدکننده
- افزایش جریان کربن یک مسیر بیوسنتیک از طریق افزایش بیان ژن‌های کدکننده برای آنزیم‌های محدودکننده سرعت و یا بلوکه کردن مکانسیم باز دارنده پس خوری و مسیرهای رقابتی
- کاهش کاتابولیسم

[1] Isopropanol
[2] DMSO
[3] Ultrasonic
[4] Ionoportic
[5] Dejesus- Gonzales and weathers
[6] Berkov

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

مهندسی متابولیک ممکن است به صورت تک مرحله یا دو مرحله انجام شود. در مهندسی تک مرحله، جهت افزایش فعالیت آنزیم از تشدید بیان[1] ژن موردنظر یا وارد نمودن ژن هترولوگوس[2] می‌توان بر یک مرحله محدودکننده سرعت، غلبه نمود. خاموش نمودن مسیرهای رقابتی و کاهش کاتابولیسم فرآورده مطلوب نیز ممکن است مد نظر قرار گیرد. آنزیم هترولوگوس ممکن است که ویژگی‌های بسیار مطلوب مانند عدم ممانعت پس خوری توسط محصولات پایین دست یا تمایل بیشتر به سوبسترا را نشان دهد [٤٥].

مُیانو[3] و همکاران (١٩٩٩) ژن *N. tabacum pmt* را به ریشه‌های مویین *Duboisia* وارد نمودند، هر چند که میزان N- متیل پوترسین نسبت به نمونه‌های شاهد دو تا چهار برابر افزایش یافت ولی افزایش معنی‌داری در آلکالوئیدهای تروپانی و پیریدینی دیده نشد. آنها همچنین T.DNA پلاسمید القاکننده ریشه (پلاسمید Ri) به همراه ژن *pmt* تنباکو را به ژنوم *H. muticus* و *Datura metel* به منظور متاثر نمودن تولید آلکالوئیدهای تروپانی، وارد نمودند. ریشه‌های مویین دارای بیان‌کننده ژن *pmt*، رشد بیشتری داشته و تروپان آلکالوئید بیشتری تولید می‌کردند [٣٠]. اخیراً ژن *pmt* تنباکو در گیاه تولیدکننده اسکوپولامین *H. niger* بیان بیش از حد شده است. لاین‌های مهندسی شده افزایش چشم‌گیری در فعالیت *pmt* و محتوی N میتل پوترسین نشان دادند، در حالی که میزان آلکالوئیدهای تروپانی تغییر نیافت [٤٦].

مهندسی تک ژن در مسیرهای بیوسنتزی روشی بسیار خوب جهت مشخص نمودن مکان یک مرحله محدودکننده خاص می‌باشد [٤٧]. به هر حال نتایج حاصل از مهندسی تک ژن در مورد ژن *pmt* نشان داد که برای تولید آلکالوئیدهای تروپانی جریان کربن[4] می‌تواند در مراحل بعدی مسیر بیوسنتزی محدود شود [٤٦].

همان‌طور که در شکل شماره ٢ دیده می‌شود، تروپینن ردوکتاز[5] نقطه انشعاب دیگر در بیوسنتز اسکوپلامین می‌باشد.

[1] Overexpression
[2] Heterologous
[3] Moyano
[4] c-flux
[5] Tropinone reductase

دو نوع تروپینن ردوکتاز مختلف از کشت‌های ریشه چندین گونه *D. stramonium*، *H. niger* و *A. belladonna* جداسازی و CDNA آنها کلون شده است [١٥]. فعالیت *trI* با بیوسنتز هیوسیامین و اسکوپولامین مرتبط است، در حالی که *trII* در شکل‌گیری سودوتروپین[1] و در نتیجه منشعب کردن جریان کربن از تروپان آلکالوئیدها به کالیستیژن‌ها[2] نقش دارد [٤٨]. گزارش‌هایی نیز مبنی بر تشدید بیان این دو آنزیم در گیاهان مربوط به این خانواده وجود دارد. برای مثال ریچر[3] و همکاران (٢٠٠٥) گزارش دادند که تشدید بیان *trI* در *A. belladonna* با افزایش محتوی هیوسیامین و اسکوپولامین همراه است، در حالی که میزان کالیستیژن ریشه‌های تراریخت نسبت به شاهد کمتر بود [٤٩].

اسکوپولامین ارزشمندترین آلکالوئید تروپانی می‌باشد و با توجه به اینکه تقاضای جهانی آن حدود ده برابر بیشتر از هیوسیامین و فرم راسمیزه آن (آتروپین) است، تلاش‌های زیادی جهت افزایش این آلکالوئید در کشت‌های In vitro صورت گرفته است [٩].

همان‌طور که در شکل شماره ٢ دیده می‌شود آخرین مرحله در مسیر بیوسنتز آلکالوئید تروپانی، اپوکسیداسیون هیوسیامین به اسکوپولامین بوده که توسط آنزیم هیوسیامین ß-6 هیدروکسیلاز (H6H) انجام می‌شود. این آنزیم مکان هدف دستورزی امیدوارکننده‌ای جهت افزایش سطح اسکوپولامین در گیاهان یا ریشه‌های تراریخت می‌باشد [٤٧]. محققین در تحقیقی با بیان بیش از حد ژن *h6h* در ریشه‌های مویین *H. muticus* موفق به تولید کلون‌های تراریختی شدند که میزان تولید در آنها ١٠٠ برابر بیشتر از شاهد بود [٥٠]. علاوه بر گزارش‌هایی که در مورد مهندسی تک مرحله *h6h* وجود دارد، مواردی نیز از مهندسی متابولیک این ژن به همراه سایر ژن‌های مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها به صورت دو مرحله‌ای وجود دارد. اخیراً ژنگ[4] و همکاران (٢٠٠٤) بیان بیش از حد ژن‌های کدکننده آنزیم بالادست (PMT) و پایین‌دست (H6H) مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها را

[1] Pseudotropine
[2] Calystegines
[3] Richter
[4] Zhang

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

گزارش نمودند. کلون‌های تراریختی که هر دو ژن را بیان می‌نمودند قادر به تولید میزان زیادی اسکوپولامین (٤١١ میلی‌گرم در لیتر) بودند که این رقم بیشترین میزان اسکوپولامینی است که تاکنون توسط یک گیاه مهندسی شده به دست آمده است [٥١].

یکی دیگر از موارد مورد توجه در زمینه مهندسی متابولیک، بیوترانسفورماسیون (تبدیلات بیوشیمیایی) می‌باشد. بیوترانسفورماسیون، استفاده از پتانسیل آنزیمی یک موجود جهت تبدیل ماده‌ای کم ارزش به ماده ارزشمند دیگر است. این پتانسیل آنزیمی ممکن است به خودی خود در یک ارگانیسم موجود باشد یا اینکه هدیه مهندسی متابولیک به واسطه انتقال یک مسیر متابولیک کامل یا تعدادی از مراحل آن در آن وجود داشته باشد. رُچا[1] و همکاران (٢٠٠٢) همزمان دو ژن *tr1* و *h6h* را به *N. tabacum* وارد نمودند. به برگ‌های جدا شده از گیاه تراریخت، هیوسیامین داده شد و همان‌طور که انتظار می‌رفت از هیوسیامین خارجی داده شده توانستند فرآورده واکنش H6H را تولید کنند [١٢]. کشت‌های ریشه مویین توتون حاوی ژن *h6h* دریافتی از *H. niger* قادر به جذب حدود ٩٥ درصد از هیوسیامین وارد شده به محیط کشت و تبدیل زیستی ٤٥ – ١٠ درصد آن به اسکوپولامین بودند [١٥]. بنابراین بیوترانسفورماسیون می‌تواند در تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین که متابولیت ارزشمندتری می‌باشد نقش شایان توجهی داشته باشد.

٧- بیورآکتورها و کشت در مقیاس وسیع: استفاده از بیورآکتورها آخرین مرحله توسعه تکنیک‌های تولید متابولیت‌های ثانویه در سیستم‌های آزمایشگاهی می‌باشد [٣٣]. محدودیت اصلی برای به کارگیری تجاری کشت‌های ریشه مویین، کشت وسیع آنها در حد صنعتی است. ریشه‌های مویین در کشت‌های بزرگ به بیوکاتالیت‌های پیچیده‌ای مبدل شده که مشکلات منحصر به فردی را به وجود می‌آورند. تکان دادن مکانیکی سبب زخم شدن ریشه‌های مویین و تولید کالوس می‌شود که این پدیده از نظر تولید متابولیت‌های ثانویه نامطلوب می‌باشد، زیرا که ایجاد بافت کالوس با تولید فرآورده‌های ثانویه همبستگی منفی دارد. رشد وابسته به مریستم ریشه‌های موئین در محیط کشت مایع سبب تولید یک توده ریشه‌ای شده به نحوی که ریشه‌های جوان در حال رشد در پیرامون و هسته‌ای از بافت مسن در مرکز این توده به وجود می‌آید. محدودیت در انتشار اکسیژن به مرکز این توده منجر به ایجاد یک بسته تقریباً غیرفعال از بافت‌های پیر می‌شود. بنابراین یکی از مشکلات اصلی برای ریشه‌های مویین فراهم‌سازی اکسیژن می‌باشد [٤٣].

در مورد آلکالوئیدهای تروپانی انواع مختلفی از بیورآکتورها مورد استفاده قرار گرفته است. ویلسون[1] (١٩٩٧) سیستم بیورآکتور Large droplet با حجم ٥٠٠ لیتر را برای کشت‌های ریشه *D. stramonium* طراحی نمود [٥٢]. در مقیاس کوچک‌تر بیورآکتور غوطه‌ور[2] تغییر یافته و بیورآکتور تانک جنبشی[3] برای تولید اسکوپولامین از کشت‌های ریشه مویین *D. metel* به کار برده شد [٥٣]. بیورآکتورهای جریان همبند[4] برای بذرالبنج مصری و *A. belladonna* و اخیراً ستون حبابی[5] برای ریشه‌های مویین *Scopolia parviflora* به کار برده شده‌اند [٥٤].

چالش‌ها و راهکارهای جدید

تاکنون فقط آنزیم‌های محدودی از چرخه تروپان آلکالوئیدها جداسازی و ژن‌های مربوطه کلون شده است. همچنین مسیر بیوسنتزی این ترکیبات و نحوه کنترل آنها به خوبی شناخته نشده است [٥٥]. این در حالی است که شناخت مکانیسم‌های کنترل‌کننده شروع بیوسنتز و تبدیل این ترکیبات از لوازم اساسی مدل سازی و پیش‌بینی مهندسی متابولیک آنها می‌باشد. آشکارسازی مسیرهای بیوسنتیک آلکالوئیدی با مشکلات زیادی روبرو است، که علت اصلی آن غلظت کم آنزیم‌های بیوسنتیک می‌باشد که جداسازی و خالص‌سازی بسیاری از آنها را توسط روش‌های سنتی مشکل ساخته است [٥٦].

[1] Rocha

[1] Wilson
[2] Airlift
[3] Stirred tank reactor
[4] Connective flow bioreactor
[5] Bubble column

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

توسعه ابزارهای ژنومیک، بررسی سریع و جامع سیستم‌های بیولوژیک را فراهم نموده است. در حقیقت با استفاده از ژنومیک قادریم تمام ژن‌های یک گیاه را مشخص نموده و با استفاده از تکنیک‌های ترانسکریپتومیک و پروتئومیک تعیین نماییم که کدام ژن‌ها در سلول یا اندام گیاهی خاصی تحت شرایط رشدی یا استرس خاص فعال یا غیرفعال می‌شوند. ارتباط دادن ژنومیک، ترانسکریپتومیک و پروتئومیک با متابولومیک به وسیله روش بیولوژی سیستم، ما را قادر به کاوش ماشین بیوشیمیایی گیاهان می‌نماید که نهایتاً منجر به کشف مسیرهای جدید و مدل‌سازی شبکه‌ها شده و مهندسی متابولیک پیش‌بینی شده را امکان‌پذیر می‌سازد [٥٦].

در اغلب موارد، از روش‌های وقت‌گیر و خسته‌کننده سنتی شناسایی و جداسازی ژن‌های مربوط به متابولیت‌های ثانویه گیاهی استفاده نمی‌شود. امروزه استفاده از تکنیک cDNA-AFLP، پایگاه‌های اطلاعاتی حاصل از EST[1]ها و توالی‌یابی کامل ژنوم بعضی گیاهان (برای نمونه *Medicago truncatula* و *Arabidpsis thaliana*) و همچنین استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر توالی‌های حفاظت شده در رده‌های آنزیمی مختلف، شناسایی ژن‌های درگیر در مسیرهای بیوسنتزی موردنظر را امکان‌پذیر نموده است [٤٤].

معمولاً در یک مسیر بیوسنتزی خاص ممکن است چندین مرحله محدودکننده وجود داشته باشد. از طرفی واردکردن چندین ژن به طور همزمان در سلول‌های گیاهی کاری مشکل و وقت‌گیر است. به منظور رفع این مشکلات تلاش‌هایی جهت تغییر بیان ژن‌های تنظیمی که کنترل ژن‌های بیوسنتزی چندگانه را بر عهده دارند صورت پذیرفته است [٣]. بیان بیش از حد فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در فعال‌سازی ژن‌های مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه، روش امیدوارکننده‌ای جهت القای بیان کل مسیر بیوسنتیک می‌باشد [٥٧]. هر چند تا به امروز هیچ گزارشی مبنی بر کلونینگ فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها وجود ندارد ولی برای تعدادی از مسیرهای بیوسنتزی مانند ایندول آلکالوئیدها و فلاونوییدها تعدادی فاکتور نسخه‌برداری شناسایی شده‌اند. البته بیان یک فاکتور نسخه‌برداری بایستی توسط تنظیم‌کننده‌های دیگر کنترل شود که در این مورد هنوز اطلاعات کاملی در دسترس نمی‌باشد [٤٧].

[1] expressed sequenced tag

منابع

1. Farsi M, Zolala J. Plant biotechnology. (in Persian). ACECR - Mashhad Branch Publication. 2003, pp: 87 - 120.

2. Starmans D, Nijhuis H. Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. *Trends in Food Science & Technol*. 1996; 7: 191 - 7.

3. Verpoorte R, Memelink J. Engineering secondary metabolite production in plants. *Crop in Biotechnol*. 2002; 8: 181 - 7.

4. Kumar J, Gupta PK. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnol Rep.* 2008; 2: 93 – 112.

5. Hughes E, Shanks J. Metabolic engineering of plants for alkaloid production. *Metabolic Engineering* 2001; 4: 41 - 8.

6. Leete E. Recent development in the biosynthesis of tropane alkaloids. *Planta Med*. 1990; 56: 339 - 52.

7. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier A. Production of secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci*. 2001; 161: 839 - 51.

8. Hashimoto T, Yun D, Yamada Y. Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. *Phytochemistry*. 1993; 42: 713 - 8.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

9. Hashimoto T, Yamada Y. Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Annu. Rev. Plant Phys*. 1994; 45: 257 - 85.

10. Lea PJ, Leegood R. Plant Biochemistry and Molecular Biology. John Wiley. 1999, pp: 385-400.

11. Milen I, Atanas I, Pavlov B. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 74: 1175 – 85.

12. Rocha P, Stenzel O, Parr A, Walton N, Christou P, Dräger B, Leech MJ. Functional expression of tropinone reductase I (trI) and hyoscyamine-6b-hydroxylase (h6h) from *Hyoscyamus niger* in *Nicotiana tabacum*. *Plant Sci*. 2002; 162: 905 - 13.

13. Bulgakov, P. Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology advances* 2008; 23 (4): 318 - 24.

14. Zhong J. Biochemical engineering of the production of plant specific secondary metabolites. *Biotechechnology*. 1993; 19: 1129 - 35.

15. Palazón J, Navarro-Ocaña A, Hernandez-Vazquez L, Mirjalili MH. Application of Metabolic Engineering to the Production of Scopolamine. *Molecules* 2008; 13: 1722 - 42.

16. Verporte R, Heijden RV, Memelink J. Engineering the plant cell Factory for production of secondary metabolite. *Transgenic Res*. 2000; 9: 323 - 43.

17. Asghari, Gh. Biotechnology of medicinal plants and herbal medicines production. (In Persian). ACECR- Isfahan Branch Publication. 2006, pp: 217 - 37.

18. Baghalian K and Naghdi Badi H. Volatile oil crops; their biology, biochemistry, and production (In Persian). Andarz Publications. 2000.

19. Palbais H, Loyola-Vargas V, Flores H, Vivanco J. Root specific metabolism: The biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cell Dev Biol. Plant.* 2001; 37: 730 - 41.

20. Zehra M, Banerjee S, Napvi A. Variation in the growth and alkaloid Production capability of the hairy roots of *Hyoscyamus albus*, *H. muticus* and Their somatic hybrid. *Plant Sci*. 1998; 13: 93 - 9.

21. Palazón J, Piñol MT, Cusido R, Morales C, Bonfill M. Application of transformed root technology to the production of bioactive metabolites. *Recent Res. Dev. Plant Phys*. 1997; 1: 125 - 43.

22. Toivonen L. Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog*. 1993; 9: 12 - 20.

23. Palazón J, Altabella T, Cusidó R, Ribó M, Piñol MT. Growth and tropane alkaloid production in *Agrobacterium* transformed roots and derived callus of *Datura*. *Biol. Plantar*. 1995; 37: 161 - 8.

24. Gritothe G, Drager B. Tropane alkaloids metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of *Atropa belladonna*. *Plant Sci.* 2002; 163: 979 - 85.

25. Sevon N, Oksman-Caldentey KM. *Agrobacterium rhizogenes* mediates transformation: Root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med*. 2002; 68: 859 - 68.

26. Guilon S, Guiller J, Gantet P. Hairy root research: recent scenario and exeting prospects. *Current opinion in plant biol*. 2006; 9: 341 - 7.

27. Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Lacoux J, Fliniaux MA, Jacquin-Dubreil A. Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* and *Agrobacterium tumefaciens* containing A, B, C rol genes only. *J. of Biotechnol*. 2000; 81: 151 - 8.

28. Moyano E, Fornalé S, Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Morales C, Piñol MT. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. *Phytochemistry*. 1999; 52: 1287 - 92.

29. Dehghan, E. The effects of tetraploid induction in transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. M.Sc. Thesis. Ferdowsi University of Mashhad. 2009, pp: 45 - 79.

30. Moyano E, Fornalé S, Palazón J, Cusidó RM, Bagni N, Piñol MT. Alkaloid production in

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

Duboisia hybrid hairy root cultures overexpressing the *pmt* gene. *Phytochemistry*. 2002; 59: 697 – 702.

31. Zolala J, Farsi M, Girdan HR, Mahmoodnia M. Producing a high scopolamine hairy root union *Hyoscyamus muticus* transformation by *Agrobactorium rhizigenes*. *J. Agric. Suitechna*. 2007; 9: 327 - 39.

32. Farsi M, Moshtaghi N, Shahriari F, Gordan HR, Raeesi M. Investigation on growth and alkaloid content of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Agricultural Sciences and Techno J.* 2005; 19: 47 - 56.

33. Georgiv M, Pavlov A, Bley T. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007; 79: 1157 - 85.

34. Flores H, Dai Y, Cuello J, Maldonado M, Loyola I. Green roots: Photosynthesis and photo autotrophy in an underground plant organ. *Plant Physiol*. 1993; 101: 363 - 71.

35. Oksman-Caldentey KM, Strauss A. Somaclonal variation of scopolamine content in protoplast derived cell culture clones of *Hyoscyamus muticus*. *Planta Med*. 1986; 52: 6 - 12.

36. Bensddek L, Gillet F, Saucedo JE, Fliniaux MA. The effect of nitrate ammonium concentration on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *J. of Biotechnol*. 2001; 85: 935 - 50.

37. Pavlov S, Berkov J, Weber T. Hyoscyamine Biosynthesis in *Datura stramonium* Hairy Root In Vitro Systems with Different Ploidy Levels. *Appl Biochem Biotechnol*. 2009; 157 (2): 210 - 25.

38. Ramachandra S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv*. 2002; 20: 101 - 53.

39. Dhawan O, Lavania U. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*. 1996; 87: 81 - 9.

40. Shahriari F, Dehghan E, Farsi M, Azizi M. Tetraploid induction of Hyoscyamus muticus L. using colchicine treatment. *Pakistan J. of Biological Sci*. 2008; 11 (24): 2653 - 9.

41. Dejesus-Gonzalez L, Weathers PJ. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Reports* 2003; 21: 809 –13.

42. Berkov S, Pavlov A, Kovatcheva P, Stanimirova P, Philipov S. Alkaloid Spectrum in Diploid and Tetraploid Hairy Root Cultures of *Datura stramonium*. *Z. für Naturforschung* 2003; 58: 42 – 6.

43. Giri A, Lakshmi-Narasu M. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol. Adv*. 2001; 18: 1 - 22.

44. Dauria JC, Gershenzon J. The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Plant Biol*. 2005; 8: 308 - 16.

45. Buckland BC, Robinson DK, Chartrain M. Biocatalysis for pharmaceuticals: Status and prospects for a key technology. *Metab Eng*. 2000; 2: 42 –8.

46. Zhang L, Yang B, Lu B, Kai G, Wang Z, Xia Y, Ding R. Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures overexpressing putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. *Planta*. 2007; 225: 887 - 96.

47. Zhang L, Kai GY, Lu B, Zhang H, Tang KX, Jiang J, Chen W. Metabolic engineering of tropane alkaloid biosynthesis in plants. *Plant Biol*. 2005; 47: 136 - 43.

48. Dräger, B. Tropinone reducates enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry*. 2006; 67: 327 - 37.

49. Richter U, Rothe G, Fabian AK, Rahfeld B, Dräger B. Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures. *J. Exp. Bot*. 2005; 56: 645 - 52.

50. Jouhikainen K, Lindgren L, Jokelainen T, Hiltunen R, Teeri TH, Oksman-Caldentey KM. Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering. *Planta*. 1999; 208: 545 - 51.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]

51. Zhang L, Ding R, Chai Y, Bonfill M, Moyano E, Oksman-Caldentey KM. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2004; 101: 6786 - 91.

52. Wilson PDG. In Hairy roots: Culture and applications. Doran PM., Ed.; Harwood Academic publisher: Amsterdam, 1997; pp: 179 - 90.

53. Cusidó RM, Palazón J, Piñol MT, Bonfill M, Morales C. *Datura metel*: In vitro production of tropane alkaloids. *Planta Med*. 1999; 65: 144 - 8.

54. Min J, Jung H, Kang S, Kim Y, Kang Y, Park D, Prasad D, Choi M. Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots. *Bioresour. Technol*. 2007; 98: 1748 - 53.

55. Arroo R, Woolley J, Oksman-Caldentey KM, In Biotechnology in Agriculture and Forestry; Pua EC, Davey MR., Eds., Transgenic crops. *Springer: Berlin-Heidelberg-New York*, 2007; pp: 189 - 204.

56. Gossens A, Rischer H. Implantation of function ad genomics for gene discovery in alkaloid producing plants. *Phytochem. Rev*. 2007; 6: 35 - 49.

57. Petersen M. Current status of metabolic phytochemistry. *Phytochemistry*. 2007; 68: 2847 – 60.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4]