

سید الشہداء علیہ السلام



نوع نشریه: دستورالعمل فنی

نام نشریه: دستورالعمل ساخت و راهبری بیوراکتورهای بالونی آزمایشگاهی کشت ریشه مویین در فاز مایع

نویسندگان: مرتضی خان احمدی، علی جلالی، کوثر مرادی، احمد سبحانی، مرتضی ابراهیمی

ویراستار علمی: دکتر داریوش داودی

ویراستار ادبی: دکتر حسن رهنما - عصمت جعفری نژاد

طراحی: محمد جداری

تهیه شده در: پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

شمارگان: ۳۰

نوبت انتشار: اول

سال انتشار: ۱۳۹۸

مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.



شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی ۵۷۲۰۹ به تاریخ ۱۳۹۸/۱۲/۲۷ است.



دستورالعمل ساخت و راهبری بیورآکتورهای بالونی

آزمایشگاهی کشت ریشه موین در فاز مایع

مرتضی خان احمدی، علی جلالی

کوثر مرادی، احمد سبحانی، مرتضی ابراهیمی

فهرست مطالب

۱	چکیده
۱	واژه‌های کلیدی
۲	مقدمه
۵	بررسی منابع
۷	ساختار بیورآکتور
۷	بدنه شیشه‌ای
۱۱	درب بیورآکتور
۱۳	ملحقات بیورآکتور
۱۵	رطوبت‌گیر جریان خروجی هوا
۱۵	فیلتر نمونه‌برداری از پایین بیورآکتور
۱۷	اسباب نمونه‌برداری
۲۰	سه‌پایه
۲۱	دستورالعمل استفاده از بیورآکتور برای کشت ریشه موئین
۲۱	اتصال تجهیزات جانبی
۲۴	استریل کردن
۲۵	آماده‌سازی پیش از کشت
۲۵	کشت بیورآکتور
۲۶	آزمایش با بیورآکتور
۳۰	فهرست منابع

۱- چکیده

تولید متابولیت‌های ثانویه زیست فعال ارزشمند از طریق کشت ریشه موین گیاهان در بیورآکتور یکی از روش‌های جایگزین کشت مرسوم است که در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی در رابطه با آن انجام گرفته و در چند مورد تجاری‌سازی شده است. یکی از ابزارهای لازم برای انجام تحقیقات در این زمینه بیورآکتورهای آزمایشگاهی هستند که نتایج بدست آمده از کشت ریشه در ارلن قبل از ورود به مرحله پایلوت در آن‌ها ارزیابی شده و تأثیر عواملی که در ارلن قابل بررسی نیستند از جمله: اثر ساختار فیزیکی ظرف، شدت هوادهی، نحوه خوراک‌دهی و ... بررسی می‌شود. نظر به طولانی بودن مدت هر آزمایش کشت ریشه که حداقل یک ماه بطول می‌انجامد، لازم است آزمایش‌ها بصورت موازی انجام گیرد که مستلزم در اختیار بودن تعداد مناسبی بیورآکتور است. لازم است بیورآکتور و تجهیزات جانبی آن تا حد امکان ارزان‌قیمت بوده و در داخل کشور با امکانات و تجهیزات در دسترس قابل ساخت باشد. یکی از انواع بیورآکتور که در کشت ریشه موین به خوبی عمل کرده است، بیورآکتورهای بالونی هستند. بجز حسگرها که استفاده از آنها ضروری نیست، سایر قسمت‌های این بیورآکتورها قابل ساخت می‌باشد. نتیجه بیش از دو سال آزمایش و تجربه با این بیورآکتورها در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی در قالب دستورالعمل فنی حاضر ارائه می‌شود. این دستورالعمل می‌تواند برای پژوهشگرانی که در زمینه کشت ریشه موین فعالیت می‌کنند، مفید و راهگشا باشد.

۲- واژه‌های کلیدی: بیورآکتور بالونی، ریشه موین، راهبری، ساخت

۳- مقدمه

بیورآکتور به دستگاه یا سیستمی اطلاق می‌شود که محیطی مناسب شامل آب، مواد مغذی و اکسیژن لازم برای رشد یک موجود زنده را فراهم می‌کند (Adelberg and Fári, 2010). بیورآکتورها به منظور تولید و تکثیر اندام‌های گیاهی، میکروب‌ها، سلول‌های گیاهی و جانوری جهت تولید زیست‌توده یا متابولیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Cui *et al.*, 2010; Dewir *et al.*, 2005; Takayama and Akita, 2008). علاوه بر این، واحدهای کنترل‌کننده‌ایی چون سیستم تنظیم pH، دما، اکسیژن، EC و همچنین واحدهای هوادهی و همزن می‌تواند به یک بیورآکتور اضافه شوند (Eibl and Eibl, 2008). ضرورت استفاده از هر یک از این واحدها بستگی به ماهیت موجود زنده و هدف نهایی دارد. از آنجا که این دستورالعمل بر کشت ریشه موئین در بیورآکتور متمرکز می‌باشد، تفاوت‌های مهم کشت ریشه موئین با کشت‌های تک‌سلولی در زیر مورد بررسی قرار می‌گیرد (Heyerdahl *et al.*, 1995; Takayama and Akita, 1994).

مهم‌ترین تفاوت از نظر مورفولوژی است. در کشت‌های تک‌سلولی، رشد و افزایش زیست‌توده با افزایش تعداد سلول‌ها همراه است و اندازه و مورفولوژی هر سلول تغییر زیادی ندارد. در کشت ریشه، تعداد ریشه‌ها ثابت مانده ولی هر ریشه با طولانی شدن و نیز تولید ریشه‌های جانبی رشد می‌کند. در حالی که در کشت‌های تک‌سلولی با همزدن مکانیکی یا پنوماتیکی (جریان حباب‌های هوا) محتویات بیورآکتور در هر تراکم سلولی همگن می‌شوند. در کشت‌های ریشه موئین همزدن مکانیکی باعث تخریب ریشه‌ها شده و همزدن پنوماتیکی تنها در مراحل اولیه رشد، همگن بودن محیط را حفظ نموده و در مرحله‌ای از رشد ریشه‌ها در نقاطی از بیورآکتور به یکدیگر چسبیده و ساکن می‌شوند و به تدریج تراکم ریشه در این نقاط افزایش می‌یابد، در حالی که سایر نقاط درون محیط کشت عاری از ریشه می‌شود (Paek *et al.*, 2001). با افزایش تراکم ریشه‌ها جریان مایع در داخل توده ریشه کاهش

یافته و محدودیت‌های مواد غذایی، اکسیژن‌رسانی و حذف دی‌اکسیدکربن تولیدی بروز می‌کند. نظر به اینکه تولید بسیاری از متابولیت‌های با ارزش از غلظت مواد غذایی و گازها تأثیر می‌پذیرد، این امر تأثیر منفی بر تولید متابولیت‌های پرازش خواهد داشت. از طرف دیگر محدودیت فضای آزاد در داخل توده، رشد ریشه‌ها را کند و به تدریج متوقف می‌کند و تولید زیست‌توده به ازای واحد حجم محیط کشت کاهش می‌یابد. بنابراین ناهمگنی رشد ناشی از مورفولوژی ریشه‌ها بهره‌وری بیورآکتور را از نظر کمی و کیفی کاهش می‌دهد (Son and Paek, 2001).

کندی رشد دومین تفاوت کشت ریشه موئین با اغلب میکروارگانیسم‌هاست (Paek et al., 2005). دوره رشد میکروارگانیسم‌ها با مقیاس ساعت و روز سنجیده می‌شود، در حالی که در مورد ریشه‌ها و سلول‌های گیاهی، دوره رشد با هفته و ماه سنجیده می‌شود. به‌طور تقریبی سرعت رشد اندام گیاهی ۱۰ مرتبه کندتر از میکروارگانیسم‌هاست. این کندی رشد اثرات مثبت و منفی زیر را بر عملکرد بیورآکتور دارد:

۱- زمان رشد متناسب با کندی رشد افزایش می‌یابد، در بیشتر موارد زمان رشد در بیورآکتورهای میکروبی کمتر از یک هفته و اغلب در حد یکی دو روز بوده اما در بیورآکتورهای ریشه موئین حداقل یک ماه است (Eibl and Eibl, 2008). زمان طولانی فرایند خطر آلودگی را افزایش می‌دهد و کوچک‌ترین مقدار آلودگی فرصت کافی برای رشد و آلوده کردن کل بیورآکتور را خواهد داشت، به‌گونه‌ای که تنها یک باکتری سریع‌الرشد در صورت ورود به بیورآکتور ۳ لیتری طی ۳ هفته به ۱۰ میلیون عدد در میلی‌لیتر خواهد رسید که به معنی آلودگی بیورآکتور است. آلودگی با مصرف مواد غذایی، تغییر اسیدیته، تولید متابولیت‌های سمی و تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده بافت‌های گیاهی باعث توقف رشد و درنهایت مرگ ریشه موئین می‌شود. کنترل آلودگی یکی از بزرگ‌ترین مشکلات بیورآکتورهای کشت ریشه موئین است (Sivakumar et al., 2010).

۲- متناسب با کندی سرعت رشد، اکسیژن مورد نیاز موجود زنده در واحد زمان کاهش می‌یابد. برای بیورآکتورهای میکروبی مقدار هوادهی یک حجم هوا به ازای هر حجم بیورآکتور در هر دقیقه بوده و برای بیورآکتورهای گیاهی این مقدار $0/1$ است. بنابراین ملزومات اکسیژن‌رسانی در بیورآکتورهای گیاهی ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر از بیورآکتورهای میکروبی است (Zobayed, 2008). در بیورآکتورهای میکروبی برای تأمین اکسیژن علاوه بر افزایش شدت هوادهی از همزدن نیز استفاده می‌شود، در حالی‌که در بیورآکتورهای گیاهی عموماً به همزدن نیاز نیست (Choi et al., 2008; Mishra and Ranjan, 2008).

۳- متناسب با کندی سرعت رشد، شدت تولید حرارت متابولیکی کاهش می‌یابد، در حالی‌که در بیورآکتورهای میکروبی، حذف حرارت متابولیکی از بیورآکتور برای ثابت نگه داشتن دما مستلزم استفاده از کویل‌های داخل بیورآکتور و یا دوجداره کردن بیورآکتور است. در بیورآکتورهای گیاهی حداقل در مقیاس آزمایشگاهی این تجهیزات مورد نیاز نبوده و تبادل حرارت با محیط از طریق جداره بیورآکتور برای حذف حرارت متابولیکی کفایت می‌کند (Wu et al., 2011).

۴- طولانی بودن زمان فرآیند رشد باعث می‌شود تعداد کمی آزمایش بتوان در هر سال با یک بیورآکتور آزمایشگاهی انجام داد، در حالی‌که با یک فرمانتور میکروبی می‌توان حداقل ۵۰ آزمایش در سال انجام داد. با یک بیورآکتور گیاهی این عدد حداکثر ۱۰ می‌باشد. بدین ترتیب برای داده‌برداری لازم است چند بیورآکتور گیاهی بصورت همزمان مورد استفاده قرار گیرد؛ که این امر مستلزم ارزان بودن ساخت بیورآکتور است.

با در نظر گرفتن نکات فوق، در این دستورالعمل سعی شده جزئیات ساخت و راهبری یک نوع بیورآکتور آزمایشگاهی مناسب و ارزان قیمت ارائه شود. این بیورآکتور که به بیورآکتور بالونی موسوم است، قبلاً در کشورهای ژاپن و کره جنوبی برای کشت ریشه مویین مورد استفاده قرار گرفته و گزارش شده است. در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی تعدادی از این نوع بیورآکتور ساخته شده و به مدت ۱۵ ماه مورد آزمایش قرار گرفته است.

۴- بررسی منابع

بیورآکتورها به منظور تکثیر انبوه سلول‌ها، بافت‌ها، جنین‌های سوماتیکی و اندام‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. تا اواسط دهه ۱۹۷۰، بیورآکتورهای مخزن همزن‌دار تنها نوع بیورآکتور ساخته شده بود و برای تکثیر میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفت. اما امروزه انواع مختلفی از بیورآکتورها ابداع و تولید شده‌اند و بنابراین دست محققین جهت انتخاب بیورآکتور مناسب کارشان باز است. اکثر تجهیزات مورد استفاده در بیورآکتورهای کشت میکروبی برای کشت سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های حساس گیاهی مناسب نیستند. به منظور مرتفع‌سازی مشکل کشت سلول‌ها، بافت‌ها و یا اندام‌های گیاهی، بیورآکتورهای مختلفی طراحی و مورد استفاده قرار گرفته است (Heyerdahl *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Matarese *et al.*, 2003; Yoeup and Chakrabarty, 2003; Paek *et al.*, 2001; Takayama and Akita, 1994; *al.*, 2014).

بیورآکتورهای مورد استفاده براساس نحوه همزدن محیط به سه دسته عمده تقسیم‌بندی می‌شوند. دسته اول دارای همزدن مکانیکی که شامل بیورآکتورهای همزن‌دار، بیورآکتورهای بشکه‌ای چرخنده و بیورآکتورهای دارای فیلتر چرخنده می‌باشد. دسته دوم بیورآکتورهای دارای همزن پنوماتیکی که شامل بیورآکتورهای با هوادهی معمولی، بیورآکتورهای دارای ستون حباب و بیورآکتورهای هوا بالابر می‌باشند. دسته سوم بیورآکتورهای فاقد حرکت که شامل بیورآکتورهای فاز گازی، بیورآکتورهای دارای غشاء اکسیژن‌رسانی و بیورآکتورهای هوادهی از سطح هستند. بیورآکتورهای دارای همزن مکانیکی رایج‌ترین بیورآکتورها در مقیاس صنعتی می‌باشند، اما برای بافت‌ها و اندام‌های گیاهی مناسب نیستند. مناسب‌ترین نوع بیورآکتورها برای بافت‌ها و اندام‌های گیاهی، بیورآکتورهای دارای ستون حباب و بیورآکتورهای هوا بالابر هستند.

مهم‌ترین مزیت‌های بیوراکتورهای دارای ستون حباب و هوا بالابر عبارتند از: ۱- تنش فیزیکی کمتر، ۲- سادگی در طراحی و ساخت، ۳- کاهش ریسک آلودگی از قسمت همزن، ۴- مصرف انرژی کمتر. مهم‌ترین تفاوت بیوراکتورهای دارای ستون حباب با بیوراکتورهای هوا بالابر در نحوه چرخش محیط و رفتار هیدرودینامیکی محیط می‌باشد. در بیوراکتورهای هوا بالابر، میزان چرخش محیط با شدت جریان هوای ورودی تعیین می‌شود و در مقایسه با بیوراکتورهای دارای ستون حباب دو جریان محیط وجود دارد: یکی جریان رو به بالا و دیگری جریان رو به پایین. اگرچه در هر دو نوع بیوراکتور جریان هوا از پایین به بالا اعمال می‌شود؛ اما بیوراکتورهای دارای ستون حباب برای کشت سلول‌ها و اندام‌های گیاهی در مقیاس بزرگ مناسب‌ترند.

مهم‌ترین عیب بیوراکتورهای دارای ستون حباب و هوا بالابر ایجاد کف در بالای بیوراکتور می‌باشد که این مورد با استفاده از ترکیبات ضدکف برطرف می‌شود، قبل از استفاده لازم است اثر این ترکیبات بر سلول‌ها و اندام‌ها مورد بررسی قرار گیرد (Leathers *et al.*, 1995; Lee, 1997). یکی از دلایل اصلی کف کردن محیط در بیوراکتورهای دارای ستون حباب و هوا بالابر، هم‌اندازه بودن قطر بیوراکتور در قسمت پایین و بالای بیوراکتور (حالت استوانه‌ای) می‌باشد. برای رفع این مشکل می‌توان قطر قسمت بالای بیوراکتور را بیشتر گرفت که به این طراحی بیوراکتورهای بالونی گفته می‌شود. این دسته از بیوراکتورها در قسمت پایین خود شکلی شبیه «T» یا «Y» دارند. قطر کم بیوراکتور در قسمت پایین و سپس افزایش قطر بیوراکتور در بالا باعث کاهش آسیب به سلول‌ها و اندام‌ها شده و در نتیجه آن تجمع کف و سلول‌های مرده در بالای بیوراکتور کاهش می‌یابد (Seon *et al.*, 1999; Son *et al.*, 1999).

بیوراکتورهای دارای ستون حباب بالونی در بسیاری از مطالعات اخیر مورد استفاده قرار گرفته‌اند. جیانگ و همکاران از بیوراکتورهای دارای ستون حباب بالونی ۵ لیتری برای کشت ریشه‌های نابجای *Oplopanax elatus* استفاده کردند و موفق شدند ۱۲/۷ گرم ریشه خشک به ازای هر لیتر محیط

کشت برداشت کنند (Jiang et al., 2015). جئونگ و همکاران از بیورآکتورهای ستون حباب‌دار بالونی ۵ لیتری برای کشت ریشه‌های جانبی *Echinacea purpurea* به منظور تولید کافئیک اسید استفاده کردند و موفق به تولید ۱۰/۴ گرم بر لیتر ریشه خشک حاوی ۲/۸ درصد شیکوریک اسید شدند که نسبت به گیاه رشد کرده در مزرعه، بیش از ۱۰ برابر ماده مؤثره بیشتری داشته است (Jeong et al., 2009). چویی و همکاران از بیورآکتورهای دارای ستون حباب بالونی ۳ لیتری به منظور کشت ریشه‌های نابجای گل راعی (*Hypericum perforatum*) استفاده کردند و موفق به تولید ۱۴/۶۵ گرم بر لیتر ریشه خشک حاوی ۰/۱۳ درصد هاپیرسین شدند (Cui et al., 2010). چویی و همکاران از بیورآکتورهای ستون حباب‌دار بالونی ۵۰۰ لیتری به منظور کشت ریشه نابجای جینسنگ استفاده کردند و از این طریق سرعت تولید جینسنگ را نسبت به کشت در مزرعه ۱۵۰ برابر افزایش دادند (Choi et al., 2000). علاوه براین، بیورآکتورهای بالونی در کشت ریشه موئین بسیاری از گیاهان دیگر نیز با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است (Baque et al., 2013; Jin et al., 2012; Min et al., 2007; Park et al., 2005; Wang and Qi, 2010; Wu et al., 2018; Yin et al., 2014).

۵- ساختار بیورآکتور

بیورآکتورهای بالونی آزمایشگاهی شامل بدنه شیشه‌ای، درب و ملحقات است که جزئیات هر یک در این قسمت شرح داده می‌شود:

۵-۱- بدنه شیشه‌ای

این بدنه که توسط شیشه‌گری ساخته شده شامل قسمت‌های زیر می‌باشد (شکل ۱):

- **قسمت کروی:** قسمت اصلی بدنه از یک بالون شیشه‌ای تشکیل یافته است که قسمت‌های دیگر توسط واحد شیشه‌گری به آن متصل می‌شوند. در کشت ریشه موئین به دلیل اینکه ریشه‌ها در سطح

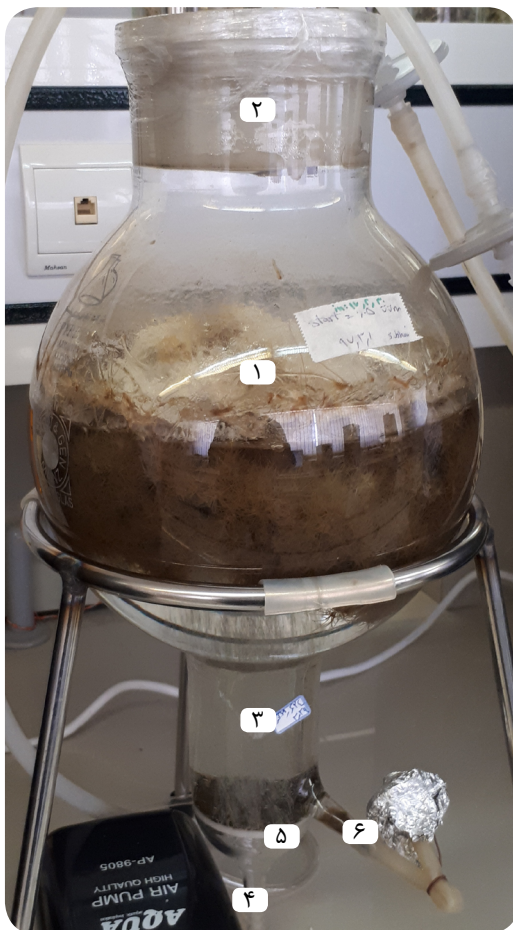
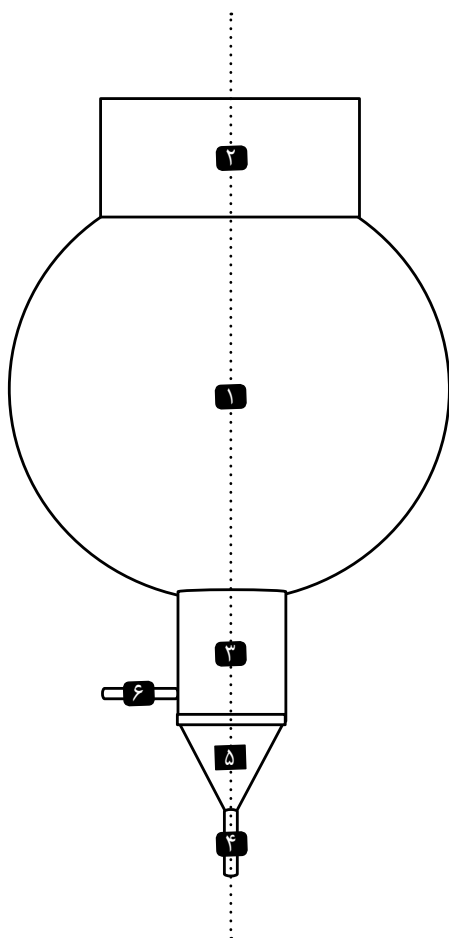
مایع تجمع یافته و رشد می‌کند، مقدار محیط کشت باید به گونه‌ای تنظیم شود که سطح آزاد مایع زیاد باشد. بنابراین محیط کشت تا نصف یا اندکی بیشتر از نصف بالون را پر کند. براین اساس در صورتی که حجم مفید ۳ لیتر مورد نیاز باشد در ساخت بیورآکتور از بالون شیشه‌ای ۴ لیتری و در صورتی که حجم مفید ۴ لیتر مورد نیاز باشد، از بالون ۵ لیتری استفاده می‌شود.

● **دهانه:** دهانه بیورآکتور باید به اندازه کافی بزرگ باشد تا ریشه رشد یافته را بتوان به راحتی از آن خارج و شست و شو داد. علاوه بر این بتوان حسگرها و سایر ملحقات را در آن تعبیه نمود. قطر حدود ۱۰ سانتی‌متر برای بیورآکتورهای ۳ تا ۶ لیتری مناسب است. دهانه بالون‌های شیشه‌ای مورد استفاده برای ساخت بیورآکتور کمتر از این مقدار است، بنابراین باید توسط شیشه‌گر تعویض شود. دهانه بصورت کاملاً استوانه‌ای ساخته می‌شود تا سطح تماس جداره داخلی آن با درب افزایش یافته و استقرار درب در آن پایدار شود و درزبندی کامل صورت گیرد. ارتفاع دهانه باید حداقل ۵ سانتی‌متر باشد تا درب به خوبی در آن پایدار شود. از طرف دیگر بهتر است ارتفاع دهانه از ۸ سانتی‌متر بیشتر نباشد، زیرا ارتفاع زیاد درب، ارتفاع کل بیورآکتور را افزایش داده و استقرار آن در اتوکلاو را با مشکل مواجه می‌کند. همچنین ارتفاع زیاد درب، طول مورد نیاز حسگر برای عبور از درب و رسیدن به داخل محیط کشت را زیاد می‌کند. لبه دهانه بهتر است تخت باشد تا درزبندی آن توسط درب بهتر انجام شود.

● **حباب‌ساز:** حباب‌ساز شامل یک لوله استوانه به قطر یک پنجم قطر بالون شیشه‌ای است که در کف آن یک قطعه لوله شیشه‌ای شیلنگ‌خور برای ورود هوا به واسطه یک تبدیل جوش داده شده است. با توجه به حجم هوادهی قطر شیلنگ خور ۶ یا ۸ میلی‌متر کفایت می‌کند. در محل اتصال تبدیل به لوله استوانه‌ای یک قرص سینتر گلاس نصب شده که نقش حباب‌ساز را ایفا می‌کند.

سینترگلاس دارای چهار نمره G1, G2, G3, G4 است. هر چه نمره سینترگلاس بالاتر باشد قطر حباب‌های تولیدی ریزتر خواهد بود. حباب ریزتر دارای نسبت سطح به حجم بزرگتری است و در نتیجه انتقال اکسیژن از حباب به محیط کشت سریع‌تر و کامل‌تر خواهد بود. علاوه بر این حباب ریزتر تنش مکانیکی کمتری به ریشه‌ها وارد می‌کند. بر این اساس حباب‌های ریزتر مطلوب‌تر هستند و بهتر است از بالاترین نمره سینترگلاس استفاده شود. به هر حال هرچه نمره سینترگلاس افزایش یابد فشار لازم برای عبور دادن هوا از آن بیشتر خواهد بود. ایجاد فشار بیشتر به کمپرسورهای گران‌قیمت‌تر نیاز داشته و مصرف انرژی را نیز افزایش می‌دهد. با توجه به توضیحات فوق و آزمون‌های به‌عمل آمده سینترگلاس نمره G3 برای ساخت بیورآکتور انتخاب شد. هوادهی بیورآکتور با این نمره از سینترگلاس به فشار کمی نیاز داشته و با کمپرسورهای آکواریمی نیز قابل انجام است.

بر لوله استوانه‌ای در بالای سینترگلاس یک لوله شینگ‌خور دیگر نصب شده که برای نمونه‌برداری و تخلیه محیط کشت از آن استفاده می‌شود. طول این لوله باید در حد امکان کوتاه باشد تا خطر شکستن آن کاهش یابد. هرچه ارتفاع لوله استوانه‌ای بیشتر باشد، ماندگاری حباب‌های هوا در بیورآکتور بیشتر شده و فرصت تبادل اکسیژن بین حباب و محیط کشت بیشتر خواهد شد. از طرف دیگر با افزایش ارتفاع لوله استوانه‌ای، ارتفاع کل بیورآکتور افزایش خواهد یافت که اتوکلاو کردن آن را نیازمند اتوکلاوهای بزرگ می‌سازد. ارتفاع کل حباب‌ساز از ابتدای شینگ‌خور تا محل اتصال به بالون بین ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر مناسب است.

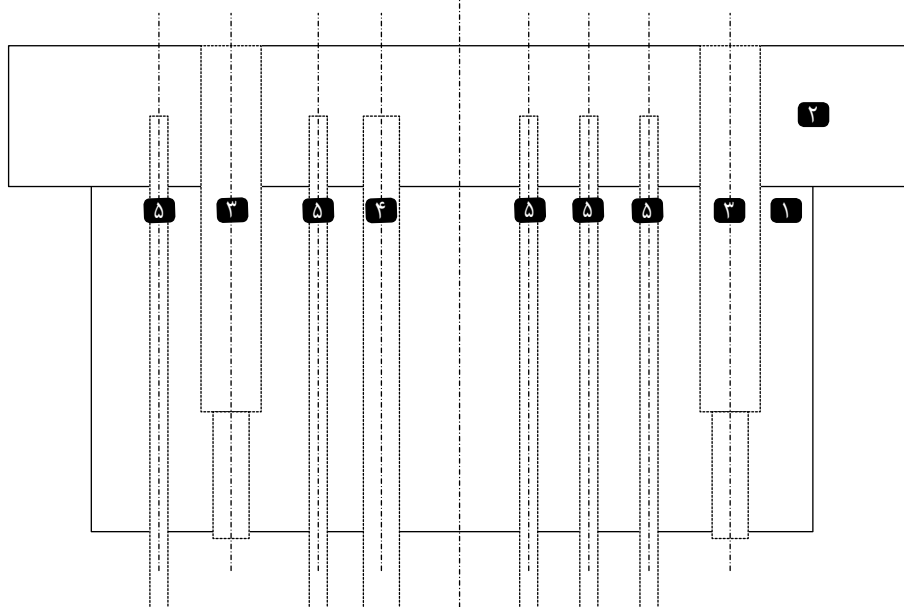
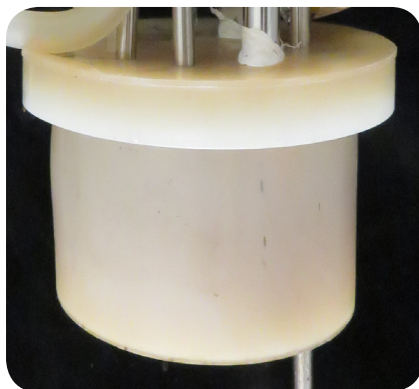


شکل ۱- اجزای بدنه شیشه‌ای بیوراکتور: ۱- قسمت کروی ۲- دهانه ۳- لوله استوانه‌ای حباب‌ساز
۴- شیلنگ خور ورود هوا ۵- سینترگلاس ۶- شیلنگ خور نمونه‌برداری

۲-۵- درب بیوراکتور

درب علاوه بر درزبندی بیوراکتور و پیشگیری از آلودگی محل استقرار حسگرها و مسیرهای ورود و خروج هوا و افزودنی‌های محیط کشت است (شکل ۲). درب بیوراکتور از جنس سیلیکون نرم قالب‌ریزی شده است. شکل درب به صورت یک استوانه به ارتفاع ۵ و قطر ۱۰ سانتی متر برابر قطر داخلی دهانه بیوراکتور است که در انتهای آن یک استوانه دیگر به قطر ۱۲ سانتی متر به عنوان لبه قرار دارد. لبه علاوه بر درزبندی مانع از افتادن درب به داخل بیوراکتور می‌شود. مقرهای تعبیه شده در درب به قرار زیر است:

- **مقر حسگر مرکب دما و pH:** یک منفذ به قطر ۱۰ میلی متر برای استقرار این حسگر در درب تعبیه شده است.
- **مقر حسگر EC:** یک منفذ به قطر ۱۰ میلی متر برای استقرار این حسگر در درب تعبیه شده است.
- **مقر حسگر اکسیژن:** این مقر یک منفذ دارای دو قسمت با قطرهای متفاوت است که قسمت قرار گرفته به سمت سطح بیرونی درب به عمق ۳ سانتی متر دارای قطر ۲۰ میلی متر و قسمت قرار گرفته به سمت سطح داخل بیوراکتور با قطر ۱۰ میلی متر است. بدین ترتیب می‌توان الکترود کوتاه اکسیژن را تا عمق بیشتری به داخل بیوراکتور فرو برد.
- **منافذ خروج هوا:** دو منفذ به قطر ۴ میلی متر برای خروج هوا در نظر گرفته شده که با عبور لوله استیل به قطر ۴ میلی متر از داخل آن امکان خروج هوا از بیوراکتور فراهم می‌شود.
- **منفذ نمونه‌گیری:** یک منفذ به قطر ۴ میلی متر برای نمونه‌برداری داخل درب تعبیه شده که یک لوله به همین قطر از داخل آن عبور می‌کند.
- **مجرای خوراک‌دهی جهت افزودن ترکیبات لازم به محیط کشت:** یک منفذ به قطر ۴ میلی متر برای این منظور در نظر گرفته شده است.
- **منفذ کنترل pH:** یک منفذ به قطر ۴ میلی متر برای افزودن اسید یا باز در صورتی که کنترل pH لازم باشد، در داخل درب تعبیه شده است.



شکل ۲- درب بیوراکتور: ۱- بدنه درب ۲- لبه درب ۳- منافذ دارای دو قطر متفاوت مقرر نصب الکترودهای کوتاه ۴- منافذ مقرر نصب الکترود بلند ۵- منافذ محل عبور لوله‌های مختلف برای خروج هوا، نمونه‌برداری، ورود افزودنی‌ها به بیوراکتور و ورود اسید و باز جهت تنظیم اسیدیته

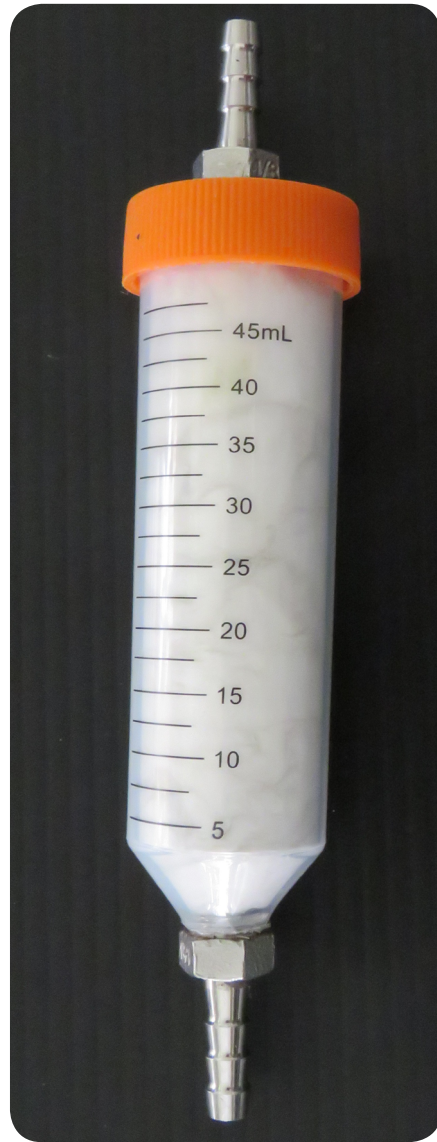
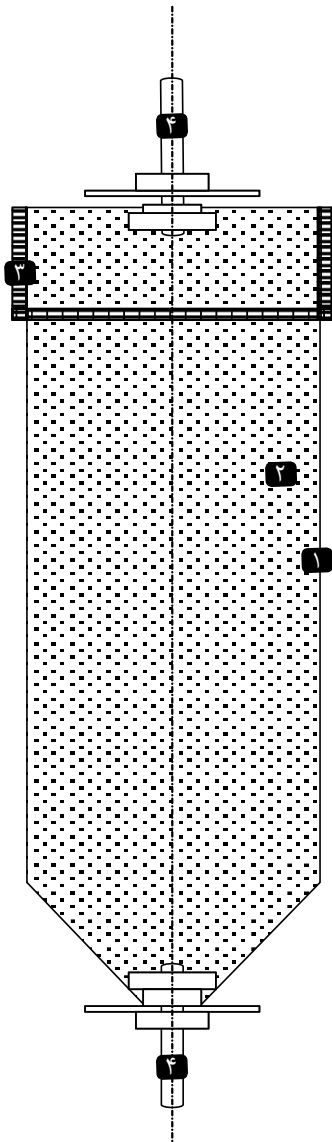
۳-۵- ملحقیات بیوراکتور

برای عملیاتی شدن بیوراکتور ملحقیات زیر به آن متصل می گردند:

- **پمپ هوا:** لازم است پمپ هوا متناسب با شدت هوادهی مورد نیاز انتخاب شود. برای کشت ریشه مویین هوادهی به میزان $0.2-0.1$ لیتر هوا به ازای هر لیتر محیط کشت کفایت می کند. با بررسی به عمل آمده در صورتی که برای حباب سازی از سیتتر گلاس نمره G3 استفاده شود، برای بیوراکتورهای ۳ تا ۶ لیتری کمپرسورهای آکواریومی مناسب است. پمپ هوا مدل Aqua AP9805 با توان $6/5$ وات برای این منظور مناسب است؛ به ویژه اینکه قابلیت تنظیم دبی هوا در آن وجود دارد و نیازی به نصب شیر در مسیر خروجی آن برای تنظیم دبی هوا وجود ندارد. این کمپرسورها صدای کمی تولید می کنند و مهم تر از همه اینکه بدون روغن هستند. کمپرسورهایی که در آنها از روغن استفاده می شود، ذرات روغن در هوای خروجی پخش می کنند که این ذرات فیلترهای هوا را مسدود می کنند. در صورت نیاز به هوادهی های شدیدتر می توان از کمپرسورهای آکواریومی بزرگ تر استفاده کرد.

- **فیلتر هوا:** برای استریل کردن هوا از فیلترهای 0.2 میکرون استفاده می شود. فیلترهای سارتوریوس به قطر ۵ سانتی متر برای حجم های هوای مورد نیاز بیوراکتورهای ۳ تا ۵ لیتری کفایت می کند. در صورت نیاز می توان دو فیلتر به صورت موازی مورد استفاده قرار داد.

- **پیش فیلتر هوا:** ورود ذرات همراه هوا به فیلتر به تدریج باعث گرفتگی آن می شود که به صورت رنگ سیاه در سمت ورود هوا به فیلتر ظاهر شده و عمر فیلتر کوتاه می شود. برای جلوگیری از این مشکل یک پیش فیلتر ساده ساخته شده که در مسیر هوا قبل از فیلتر ورودی هوا نصب می شود (شکل ۳). این پیش فیلتر متشکل از یک فالكون ۵۰ میلی لیتر است که در درب و انتهای آن دو شیلنگ خور نصب شده اند. داخل فالكون از پشم مصنوعی یا پنبه طبیعی پر شده است.



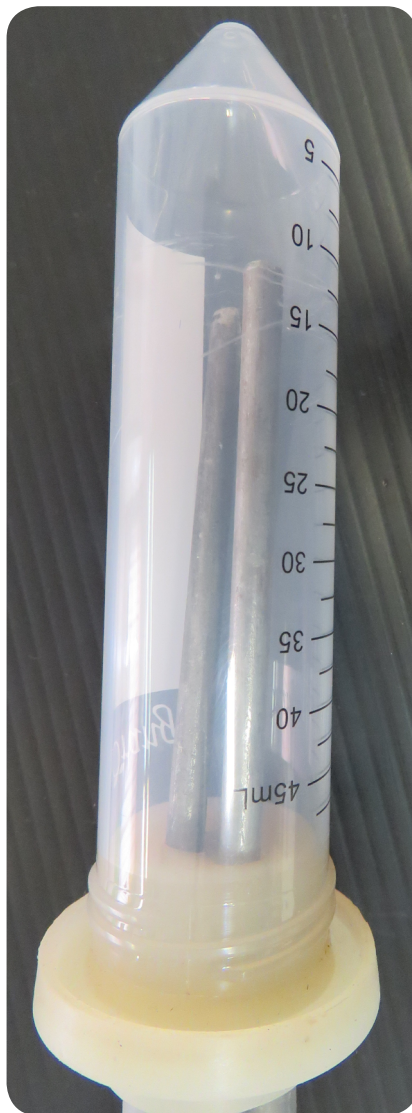
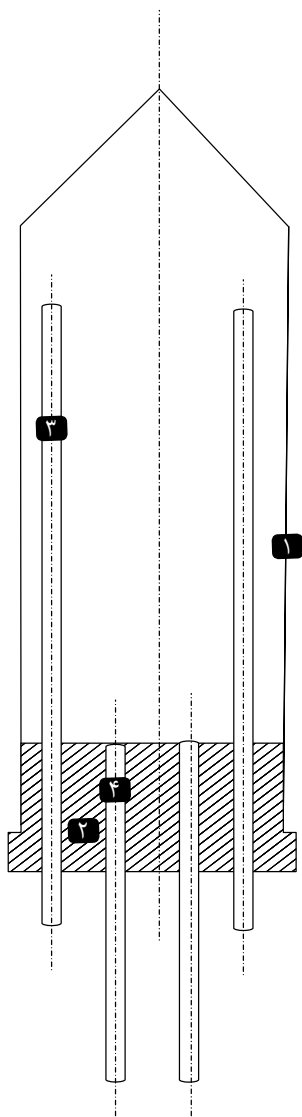
شکل ۳- پیش‌فیلتر هوا: ۱- بدنه فالكون ۵۰ میلی‌لیتری، ۲- پنبه مصنوعی، ۳- درب فالكون، ۴- سرشیلنگی از جنس فولاد ضد زنگ به همراه واشر و پیچ

۴-۵- رطوبت گیر جریان خروجی هوا

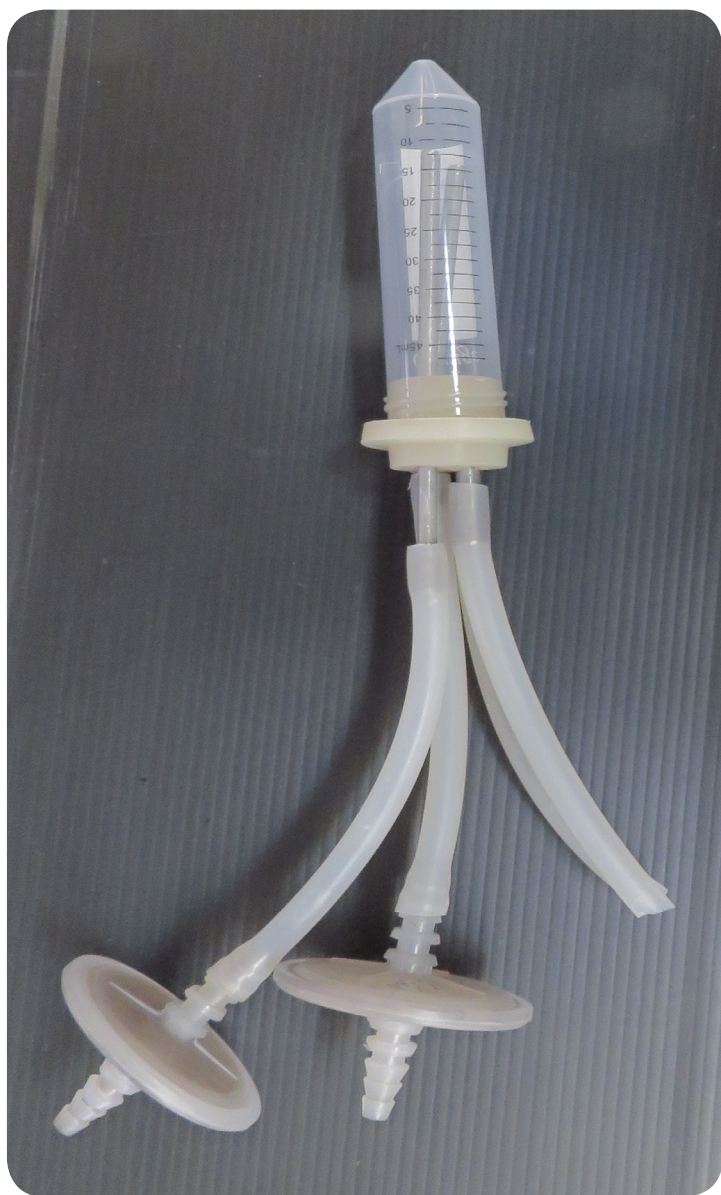
برای گرفتن ذرات آب همراه با جریان هوای خروجی از بیورآکتور، قبل از ورود به فیلتر هوای خروجی یک رطوبت گیر قرار داده می شود (شکل ۴). این رطوبت گیر شامل یک فالدکون ۵۰ میلی لیتری است که دهانه آن با یک درپوش از جنس سیلیکون به ضخامت ۲ سانتی متر مسدود شده است و دو لوله استیل با قطر ۴ میلی متر از داخل درب سیلیکونی عبور داده شده و به داخل فالدکون وارد شده است. دو لوله کوتاه و دارای طول حدود ۵ سانتی متر بوده و پس از عبور از داخل سیلکون، ۳ سانتی متر آن بیرون می ماند. دو لوله دیگر بلند و دارای طول ۱۰ سانتی متر بوده و پس از عبور از داخل سیلکون حدود ۵ سانتی متر به داخل فالدکون رفته و ۳ سانتی متر آن بیرون می ماند. سر لوله های بلند که در داخل فالدکون قراردارد خم شده تا احتمال ورود قطرات آب به داخل آن کمتر شود. دو لوله خروج هوای بیورآکتور به دو لوله کوتاه وصل می شود. لازم است رطوبت گیر به صورت عمودی نصب شود به طوری که درب سیلیکونی در پایین قرار گیرد که می تواند مستقیماً بر روی درب بیورآکتور وصل شده و یا با رابط شیلنگ در فاصله مناسبی از بیورآکتور نصب شود. دو شیلنگ نیز لوله های بلند را به فیلترهای هوای خروجی متصل می کند. فیلترهای هوای خروجی نیز فیلترهای ۰/۲ میکرون به قطر ۵ سانتی متر هستند. نحوه اتصال فیلترها به رطوبت در شکل ۵ نشان داده شده است.

۴-۵- فیلتر نمونه برداری از پایین بیورآکتور

یک فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرون مناسب برای فیلتر کردن محلول های آبی به واسطه یک شیلنگ سیلکون به سرشیلنگی قسمت استوانه ای حباب ساز متصل می شود. در این روش نمونه برداری، نمونه فیلتر شده و سلول های گیاهی یا آلودگی احتمالی از نمونه جدا می شود. بنابراین این نمونه برداری برای بررسی ذرات موجود در نمونه مناسب نیست.



شکل ۴- رطوبت گیر جریان هوای خروجی از بیوراکتور: ۱- بدنه فالكون ۵۰ میلی لیتری، ۲- درپوش سیلیکونی، ۳- لوله های استیل بلند برای خروج هوا از رطوبت گیر، ۴- لوله های کوتاه برای ورود هوا از بیوراکتور به رطوبت گیر



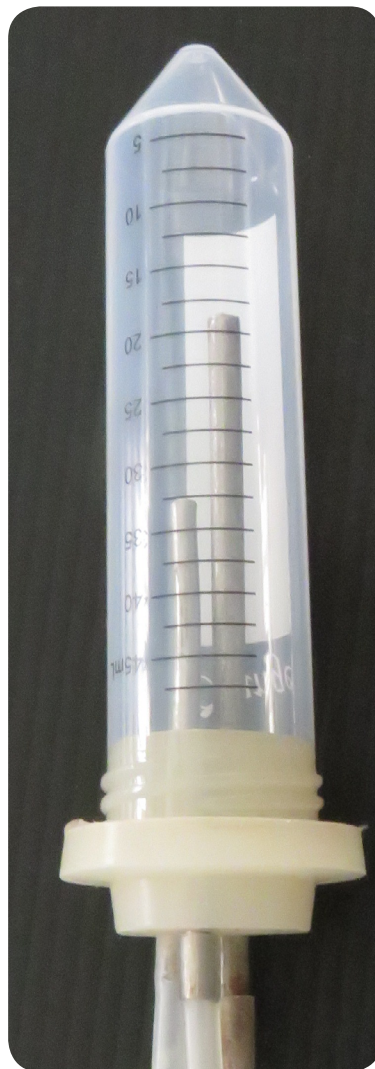
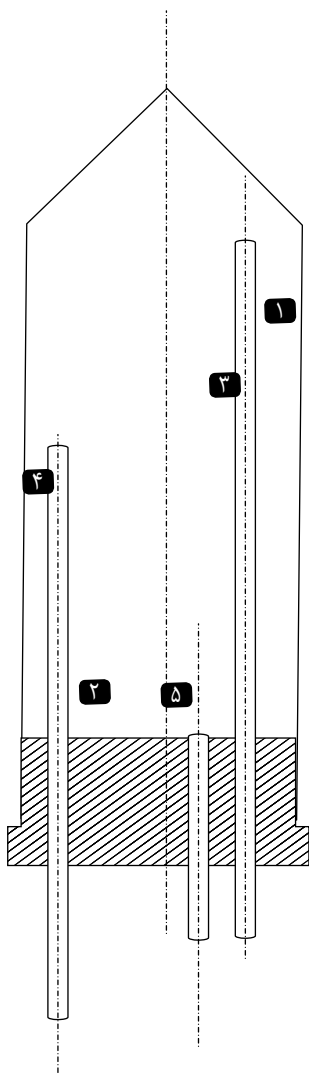
شکل ۵- نحوه اتصال فیلترهای هوا به رطوبت گیر هوای خروجی از بیورآکتور

برای تهیه نمونه فیلتر نشده از محلول، از ابزار نمونه برداری دیگری استفاده می شود که در زیر شرح داده می شود.

۶-۵- اسباب نمونه برداری

برای برداشت نمونه از محلول درون بیورآکتور می‌توان یک فیلتر ۰/۲ میکرون به سر خروجی شیلنگ نمونه برداری متصل نمود و با کمک سرنگ نمونه برداری را انجام داد (شکل ۶). این روش باعث حذف سلول‌های داخل محیط کشت می‌شود. آغشته شدن فیلتر به محیط کشت، خطر رشد میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده در فواصل بین نمونه‌گیری را افزایش می‌دهد. برای رفع این مشکل یک رابط نمونه برداری ساخته شد که از لحاظ ساختار، مشابه رطوبت‌گیر بوده و شامل یک فالكون ۵۰ میلی‌لیتری با درپوش سیلیکونی است که سه لوله استیل با قطر ۴ میلی‌متر به داخل آن وارد شده است. طول یک لوله ۱۰ سانتی‌متر بوده و با عبور از درپوش سیلیکونی وارد فالكون شده و ۳ سانتی‌متر آن در خارج از فالكون باقی می‌ماند. لوله دوم به طول ۸ سانتی‌متر، که ۵ سانتی‌متر آن وارد درپوش فالكون می‌شود و لوله سوم به طول ۵ سانتی‌متر که ۳ سانتی‌متر آن در خارج از درپوش قرار دارد. لوله ۱۰ سانتی‌متری به واسطه یک شیلنگ کوتاه (حدود ۱۵ سانتی‌متر) به یک فیلتر ۰/۲ میکرون سرنگی متصل می‌شود. لوله ۸ سانتی‌متری به شیلنگ نمونه برداری از داخل بیورآکتور متصل می‌شود. سر بیرونی لوله کوتاه به یک شیلنگ وصل شده و سر دیگر آن مسدود بوده و ترجیحاً در یک فالكون حاوی الکل ۷۰ درصد قرار داده می‌شود. این فالكون نیز به صورت عمودی در بالای بیورآکتور نصب می‌شود؛ به طوری که درب سیلیکونی در قسمت پایین قرار گیرد. برای نمونه برداری، یک سرنگ به سر فیلتر سرنگی متصل و با مکش هوا به داخل فالكون خلاء ایجاد شده که باعث می‌شود محیط کشت از داخل شیلنگ نمونه برداری به داخل فالكون مکیده شود. مسیر شیلنگ نمونه برداری مسدود شده و سر شیلنگ متصل به لوله کوتاه در یک ظرف نمونه برداری قرار داده می‌شود. با تزریق هوا توسط سرنگ به داخل فالكون فشار ایجاد شده و نمونه محلول از فالكون به ظرف نمونه برداری تخلیه می‌شود. سپس لوله نمونه برداری مسدود شده و سر آن در الکل ۷۰ درصد قرار داده می‌شود. لازم است انتهای دو

لوله بلند داخل فالكون با يكديگر فاصله داشته باشد؛ در غير اين صورت ممكن است نمونه به داخل فیلتر سر سرنگی کشیده شود.



شكل ۶- اسباب نمونه برداری: ۱- بدنه فالكون ۵۰ میلی لیتری، ۲- درپوش سیلیکونی، ۳- لوله بلند برای تخلیه یا تزریق هوا به داخل فالكون، ۴- لوله ورود محلول نمونه از بیورآكتور به فالكون، ۵- لوله تخلیه محلول نمونه داخل فالكون به بیرون

۷-۵- سه پایه

سه پایه از لوله‌ای به قطر ۸ میلی‌متر ساخته شده است (شکل ۷). قطعه‌ای از لوله به شکل حلقه درآورده و سه پایه به آن جوش داده شده می‌شود. طول پایه به گونه‌ای انتخاب می‌شود که سرشیلنگی ورود هوا به بیوراکتور حداقل ۵ سانتی‌متر با زمین فاصله داشته باشد تا محدودیتی برای اتصال شیلنگ هوا به وجود نیاید. از طرف دیگر بلندتر گرفتن پایه نیز برای اتوکلاو کردن محدودیت ایجاد می‌کند.



شکل ۷- سه پایه استیل برای استقرار و جابه‌جا کردن بیوراکتور

۶- دستورالعمل استفاده از بیورآکتور برای کشت ریشه موین

بیورآکتور بالونی ساخته شده به روش فوق برای کشت ریشه و سلول‌های گیاهی و نیز بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قابل استفاده است. در اینجا روش آماده‌سازی و راهبری بیورآکتور شرح داده می‌شود.

۶-۱- اتصال تجهیزات جانبی

۱- قرار دادن پایه بر روی بیورآکتور: نگهداری و جابجایی و استقرار بیورآکتور در طول عملیات اتصال ملحقات، اتوکلاو کردن و انجام فرآیند به همراه پایه خواهد بود.

۲- مسیر ورود هوا: شیلنگ ورود هوا به شیلنگ‌خور و فیلتر هوا به سر دیگر شیلنگ متصل می‌شود. با توجه به اینکه پس از پر کردن بیورآکتور با محیط کشت، مایع به تدریج از سینترگلاس عبور کرده و وارد شیلنگ می‌شود، لازم است طول شیلنگ اتصال سر شیلنگی به فیلتر، به اندازه کافی بلند باشد؛ به طوری که بتوان آن را به درب بیورآکتور آویزان و فیلتر در بالاترین قسمت قرار گیرد تا از ورود محیط کشت به آن جلوگیری شود (شکل ۸). فیلترهای هوا دارای مسیرهای جداگانه ورود و خروج هوا هستند و مسیر خروج فیلتر باید به شیلنگ رابط فیلتر و بیورآکتور وصل شود. سمت دیگر فیلتر به واسطه یک شیلنگ به پیش‌فیلتر متصل می‌شود. استفاده از پیش‌فیلتر اختیاری است و بجای پیش‌فیلتر می‌توان از یک فیلتر دیگر استفاده کرد که سری کردن دو فیلتر، احتمال آلودگی بیورآکتور از طریق هوا را به شدت کاهش داده و افت فشار مسیر را افزایش خواهد داد. همچنین می‌توان دو فیلتر و یک پیش‌فیلتر را به صورت سری به کار برد. در صورتی که افت فشار فیلترها باعث کاهش دبی هوا شود، می‌توان با استفاده از سه‌راهی، دو یا چند فیلتر را موازی نمود. ورودی فیلترها با کمک شیلنگ به خروجی پمپ هوا متصل می‌شود. برای اندازه‌گیری جریان هوا می‌توان بین پمپ هوا و فیلتر یا پیش‌فیلتر، روماتر قرار داد. روماتر با دامنه بین ۰ تا ۱ لیتر در دقیقه برای اکثر کاربردها مناسب بوده

و برای شدت‌های هوادهی زیاد می‌توان از روتامتر ۰ تا ۱۰ لیتر در دقیقه استفاده نمود (شکل ۸). لازم به ذکر است که قبل از اتوکلاو کردن فقط فیلتر و پیش‌فیلتر هوا به بیوراکتور متصل می‌شوند و اتصال روتامتر و پمپ هوا بعد از اتوکلاو کردن انجام خواهد شد.

۳- شیلنگ نمونه‌برداری و تخلیه: شیلنگ نمونه‌برداری به طول حدود ۱۰ سانتی‌متر به شیلنگ‌خور پایین بیوراکتور متصل شده و سمت دیگر آن به یک فیلتر سرنگی مناسب برای فیلتراسیون محلول‌های آبی متصل می‌شود. مسیر شیلنگ با تا کردن و بستن سیم نازک کور می‌شود.

۴- مسیر خروج هوا: خروج هوا با عبور از رطوبت‌گیر انجام می‌شود. برای نصب رطوبت‌گیر با کمک دو تکه شیلنگ کوتاه، لوله‌های ورود هوای رطوبت‌گیر به لوله‌های خروج هوای بیوراکتور متصل می‌شوند؛ به‌گونه‌ای که لبه لوله‌های استیل خروجی از رطوبت‌گیر با لبه لوله‌های استیل خروجی از درب بیوراکتور روی یکدیگر قرار گرفته و با هم تماس یابند. بدین ترتیب رطوبت‌گیر در جای خود ثابت شده و به‌صورت عمودی روی درب قرار خواهد گرفت. همچنین می‌توان از لوله استیل یک تکه برای برقراری اتصال بین رطوبت‌گیر و درب بیوراکتور استفاده کرد که در این حالت استقرار رطوبت‌گیر ثابت‌تر خواهد بود. در صورت نیاز می‌توان به کمک شیلنگ‌های بلندتر، رطوبت‌گیر را به درب بیوراکتور متصل نمود که در این حالت برای عمود قرار گرفتن رطوبت‌گیر به یک پایه مجزا نیاز خواهد بود.

۵- نصب رابط نمونه‌برداری: در صورتی‌که به نمونه‌برداری از محتویات بیوراکتور بدون فیلتر کردن نیاز باشد، رابط نمونه استفاده می‌شود. این رابط یک ورودی به بیوراکتور داشته و توسط یک لوله استیل مستقیماً به درب بیوراکتور متصل می‌شود. لوله باید به اندازه کافی بلند باشد درون مایع بیوراکتور فرو رود.



شکل ۸- روش اتصال تجهیزات جانبی بیوراکتور: ۱- نحوه صحیح استقرار فیلتر هوای ورودی، ۲- روتا متر، ۳- کمپرسور هوا، ۴- مسیر نمونه برداری و تخلیه، ۵- رطوبت گیر جریان هوای خروجی

۶- نصب شیلنگ ورود خوراک: برای افزودن خوراک به بیوراکتور در فرآیند خوراک‌دهی یا افزودن مقطعی مواد مغذی، یک شیلنگ به لوله استیل مربوطه که در درب بیوراکتور تعبیه شده است، متصل شده و سر دیگر آن به یک قطعه کوتاه لوله استیل و یا یک فیلتر سرسرنگی متصل می‌شود. در صورتی که خوراک‌دهی به بیوراکتور، لوله استیل مناسب بوده و می‌توان شیلنگ مخزن خوراک را به آن متصل نمود. اگر افزودن مقطعی مقادیر کم از ترکیبات مختلف مورد نیاز باشد، فیلتر سرسرنگی مناسب است و با کمک سرنگ می‌توان ترکیبات موردنظر را به بیوراکتور تزریق نمود. فیلتر سرسرنگی و یا لوله استیل با کمک آلومینیم پوشانده می‌شود تا خطر آلودگی آن کاهش یابد. قبل از استریل کردن بیوراکتور، شیلنگ رابط تا شده و با سیم بسته می‌شود تا مسیر مسدود شود.

۷- نصب شیلنگ ورود اسید و باز در صورت نیاز به کنترل pH: مشابه شیلنگ ورود خوراک نصب می‌شود و چون تزریق اسید به کمک پمپ پریستالتیک انجام می‌شود، انتهای شیلنگ یک قطعه لوله استیل قرار داده می‌شود تا بتوان آن را به شیلنگ پمپ متصل کرد.

۸- مسدود نمودن منافذ باقی‌مانده: حسگرهای مختلف پس از مرحله استریل کردن به بیوراکتور متصل می‌شوند، بنابراین منافذ محل استقرار آنها در درب بیوراکتور با کمک فالكون‌های ۱۰ میلی‌لیتری مسدود می‌شود.

۶-۲- استریل کردن

برای استریل کردن موارد زیر انجام می‌شود:

حسگرهای قابل اتوکلاو در ظروف استوانه‌ای قرار داده شده و درب ظرف با فویل آلومینیم بسته می‌شود.

۱- محیط کشت به مقدار معین تهیه می‌شود. مقدار مناسبی محیط کشت (حدود ۰/۵ تا ۱ لیتر) داخل یک ظرف درب‌دار یا ارلن با درپوش آلومینیمی ریخته می‌شود تا پس از اتوکلاو کردن برای نگهداری

ریشه‌های بریده شده به مدت چند روز استفاده شود. در صورت آلوده شدن ریشه‌ها در طی عملیات برش از ورود آن به بیورآکتور و از دست رفتن محیط کشت جلوگیری می‌شود. باقی‌مانده محیط کشت به‌داخل بیورآکتور ریخته می‌شود و درب بیورآکتور نصب می‌شود.

۲- مسیر ورود هوا به بیورآکتور در حد فاصل بین فیلتر و سر شیلنگی بدنه بیورآکتور با خم کردن و پیچیدن سیم مسدود شده تا از ورود محیط کشت و بخار به داخل فیلتر در هنگام اتوکلاو کردن هوا جلوگیری شود.

۳- مسیر خروج هوا باز گذاشته می‌شود تا از افزایش فشار داخل بیورآکتور در حین اتوکلاو کردن جلوگیری شود.

۴- برای جلوگیری از آلوده شدن دیواره ظروف پس از اتوکلاو و انتقال آلودگی به لامینار، ظرف حاوی حسگرها و بیورآکتور هر یک در داخل کیسه پلاستیکی و ظرف حاوی محیط کشت در داخل دو لایه کیسه پلاستیکی قابل اتوکلاو قرار داده می‌شوند. سپس مقدار کمی آب در هر کیسه ریخته شده و درب کیسه‌ها بسته می‌شود.

۵- کیسه‌ها داخل اتوکلاو قرار داده و به مدت حداقل ۳۰ دقیقه استریل می‌شوند.

۶- پس از سرد شدن اتوکلاو کیسه حاوی بیورآکتور و کیسه حاوی حسگرها در جای خنک و تمیز انبار می‌شوند.

در روش دیگر می‌توان درب بیورآکتور و اتصالات آن را جداگانه داخل یک پلاستیک قرار داد و استریل نمود و درب بیورآکتور را با ورق آلومینیم پوشاند و استریل کرد.

۶-۳- آماده‌سازی پیش از کشت:

- ۱- کیسه حاوی ظرف محیط کشت به کنار لامینار منتقل شده و پس از خارج کردن از کیسه رویی در زیر لامینار قرار داده می‌شود.
- ۲- ریشه‌های موردنظر به قطعات مناسب خرد شده و در داخل ظرف حاوی محیط کشت ریخته و درب کیسه پلاستیک بسته می‌شود.
- ۳- ظرف که در داخل کیسه پلاستیک دوم قرار دارد به شیکر منتقل شده و به مدت حداقل ۳ روز همزده می‌شود تا از عدم وجود آلودگی اطمینان حاصل شود.

۶-۴- کشت بیورآکتور:

- ۱- کیسه حاوی بیورآکتور به کنار لامینار منتقل، بیورآکتور از آن خارج و در زیر لامینار قرار داده می‌شود.
 - ۲- کیسه‌ای که ظرف حاوی ریشه‌ها داخل آن قرار دارد، از روی شیکر برداشته و ظرف در کنار لامینار از آن خارج و محتویات ظرف داخل بیورآکتور تخلیه می‌شود.
 - ۳- درب بیورآکتور محکم در جای خود قرار داده و اطراف لبه آن با پارافیلیم پوشانده می‌شود.
 - ۴- ظرف حاوی حسگرها نیز در زیر لامینار از پلاستیک خارج و حسگرها در مقرهای خود نصب می‌شوند.
 - ۵- بیورآکتور به محل استقرار منتقل و پمپ هوا به آن متصل شده و هوادهی آغاز می‌شود.
 - ۶- در صورتی که کنترل pH مدنظر باشد، پمپ‌های اسید و باز به شیلنگ‌های مربوطه متصل شده و به کامپیوتر متصل خواهند شد.
- همان‌طور که در مقدمه دستورالعمل شرح داده شد، کنترل دما در کشت اندام گیاهی صرفاً با کنترل دمای محیط صورت می‌گیرد و نیازی به ابزار کنترل دما در درون بیورآکتور نیست.

۵-۶- آزمایش با بیورآکتور

برای آزمایش بیورآکتورهای طراحی شده، ریشه‌های موین گل راعی در ۶ بیورآکتور ۴ لیتری به مدت ۵ هفته مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۹). آزمایش با ۲ تیمار هوادهی و ۳ تکرار انجام شد. هر واحد آزمایش حاوی ۳ لیتر محیط MS با غلظت ۵۰ درصد، به همراه تنظیم‌کننده رشد IBA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و ساکارز به مقدار ۳۰ گرم در لیتر استفاده شد. ۱۸ گرم ریشه به بیورآکتور اضافه و میزان هوای ورودی طبق جدول ۱ تنظیم شد. بیورآکتورها پس از ۵ هفته برداشت شدند و نتایج بدست آمده با استفاده از طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. دو تیمار از نظر حجم محیط باقی‌مانده، وزن تر و خشک ریشه نهایی، میزان ساکارز، گلوکز و فروکتوز محیط کشت، EC و pH با هم مقایسه شدند.

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، از نظر حجم باقی‌مانده محیط کشت، تیمار ۱ به دلیل هوادهی کمتر، مقدار بیشتری دارد که این مقدار بیشتر نشان از تبخیر کمتر دارد. از نظر وزن تر، تیمار ۲ به طور معنی‌داری وزن زیادتری دارد (در سطح ۵ درصد)، در حالی که از نظر وزن خشک تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. دلیل این اتفاق می‌تواند تراکم بیشتر ریشه‌ها در تیمار با هوادهی شدیدتر باشد (شکل ۱۰). تراکم بیشتر باعث محبوس شدن بیشتر آب در بین ریشه‌ها و افزایش وزن تر می‌شود. دلیل تراکم زیادتر ریشه‌ها در تیمار با هوادهی شدیدتر، تجمع بیشتر ریشه‌ها در سطح مایع هفته‌های اولیه می‌باشد. مقدار زیادتر EC و گلوکز محیط در تیمار با هوادهی شدیدتر به دلیل تبخیر بیشتر رخ داده است.



شکل ۹- بیوراکتورهای ۴ لیتری جهت اعمال تیمارهای هوادهی (پایان هفته چهارم)

جدول ۱- نحوه اعمال تیمارهای هوادهی

تغییرات هوادهی (VVM)		
تیمار ۱	تیمار ۲	زمان (هفته)
۰/۰۱	۰/۰۵	۲
۰/۰۳	۰/۰۸	۳
۰/۰۵	۰/۱	۴

جدول ۲- مقایسه میانگین متغیرهای تیمارهای هوادهی پس از ۵ هفته

متغیر	میانگین تیمار ۱	میانگین تیمار ۲
حجم باقی مانده محیط (لیتر)	۲/۳۹ a*	۲/۱۸ b
وزن تر (گرم)	۴۶۰/۰۰ b	۵۱۰/۰۰ a*
وزن خشک (گرم)	۳۷/۱۲ a	۳۷/۵۲ a
EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	۷۹۸/۳۳ b	۸۴۳/۰۰ a*
pH	۶/۰۷ b	۶/۳۴ a*
ساکارز (گرم بر لیتر)	۰/۰۰ a	۰/۰۰ a
گلوکز (گرم بر لیتر)	۲/۱۸ b	۳/۱۶ a*
فروکتوز (گرم بر لیتر)	۶/۰۵ a	۶/۱۰ a

مقادیر بزرگ تر و معنی دار در سطح ۵ درصد با * مشخص شده اند.



شکل ۱۰- توده ریشه تولید شده در بیورآکتور تیمار ۱ (بالا) و تیمار ۲ با هوادهی شدیدتر (پایین). ریشه‌ها در بیورآکتور با هوادهی بیشتر متراکم‌تر و پررنگ‌تر می‌باشند.

۷- فهرست منابع

- Adelberg J, Fari MG (2010) Applied physiology and practical bioreactors for plant propagation. *Propagation of Ornamental Plants*, 10: 205–219.
- Baque MA, Moh SH, Lee EJ, Zhong JJ, Paek KY (2012) Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances*, 30: 1255–1267.
- Baque MA, Shiragi MHK, Moh SH, Lee EJ, Paek KY (2013) Production of biomass and bioactive compounds by adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* L. in a liquid-phase airlift balloon-type bioreactor. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 49: 737–749.
- Choi SM, Son SH, Yun SR, Kwon OW, Seon JH, Paek KY (2000) Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 62: 187–193.
- Choi YE, Kim YS, Paek KY (2008) Types and designs of bioreactors for hairy root culture. In: *Plant Tissue Culture Engineering*. Springer, 161–172.
- Cui XH, Chakrabarty D, Lee EJ, Paek KY (2010) Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technology*, 101: 4708–4716.
- Dewir YH, Chakrabarty D, Hahn EJ, Paek KY (2005) Reversion of inflorescence development in *Euphorbia millii* and its application to large-scale micropropagation in an airlift bioreactor. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80(5): 581–587.
- Eibl R, Eibl D (2008) Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochemistry Reviews*, 7: 593–598.
- Honda H, Liu C, Kobayashi T (2001) Large-scale plant micropropagation, in: *Plant Cells*. Heyerdahl PH, Olsen OAS, Hvostlef-Eide AK (1995) Engineering aspects of plant propagation in bioreactors. In: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MAL (eds) *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Springer, Dordrecht Springer, 157–182.
- Jeong JA, Wu CH, Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY (2009) Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14: 91–98.
- Jiang YJ, Piao XC, Liu JS, Jiang J, Lian ZX, Kim MJ, Lian ML (2015) Bioactive compound production by adventitious root culture of *Oplapanax elatus* in balloon-type airlift bioreactor systems and bioactivity property. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 123: 413–425.

- Jin, YX, Cui XH, Paek KY, Yim YH (2012) A strategy for enrichment of the bioactive sphingoid base-1-phosphates produced by *Hypericum perforatum* L. in a balloon type airlift reactor. *Bioresource Technology*, 123: 284–289.
- Kim SJ, Hahn EJ, Heo JW, Paek KY (2004) Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae* (Amsterdam). 101: 143–151.
- Leathers RR, Smith MAL, Aitken-Christie J (1995) Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary metabolism, in: *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Springer, 187–214.
- Lee YH (1997) Design of bioreactor system for small and pilot scale cultivation of plant cells. *Chungbuk Natl. Univ. Korea*.
- Matarese F, Cuzzola A, Scalabrelli G, D'Onofrio C (2014) Expression of terpene synthase genes associated with the formation of volatiles in different organs of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry*, 105: 12–24.
- Min JY, Jung HY, Kang SM, Kim YD, Kang YM, Park DJ, Prasad DT, Choi MS (2007) Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots. *Bioresource Technology*, 98: 1748–1753.
- Mishra BN, Ranjan R (2008) Growth of hairy root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 49: 1–10.
- Paek KY, Hahn EJ, Son SH (2001) Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 37: 149–157.
- Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants, in: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, 95–116.
- Park SY, Ahn JK, Lee WY, Murthy HN, Paek KY (2005) Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Science*, 168: 1221–1225.
- Seon JH, Yoo KW, Cui YY, Kim MH, Lee SJ, Son SH, Paek KY (1999) Application of bioreactor for the production of saponin by adventitious roots cultures in *Panax ginseng*, in: *Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st Century*. Springer, 329–332.
- Sivakumar G, Liu C, Towler MJ, Weathers PJ (2010) Biomass production of hairy roots of *Artemisia annua* and *Arachis hypogaea* in a scaled up mist bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 107: 802–813.

- Son SH, Choi SM, Yun SR, Kwon OW, Lee YH, Paek KY (1999) Large-scale culture of plant cell and tissue by bioreactor system. *Journal of Plant Biotechnology*, 1: 1–7.
- Son SH, Paek KY (2001) Large-scale production of medicinal plant species: the application of bioreactors for production of ginseng roots, in: *Development of Plant-Based Medicines: Conservation, Efficacy and Safety*. Springer, 139–150.
- Takayama S, Akita M (2008) Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation, in: *Plan Tissue Culture Engineering*. Springer, 83–100.
- Takayama S, Akita M (1994) The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 39: 147–156.
- Wang GR, Qi NM (2010) Influence of mist intervals and aeration rate on growth and second metabolite production of *Pseudostellaria heterophylla* adventitious roots in a siphon-mist bioreactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15: 1059–1064.
- Wu CH, Tang J, Jin ZX, Wang M, Liu ZQ, Huang T, Lian ML (2018) Optimizing co-culture conditions of adventitious roots of *Echinacea pallida* and *Echinacea purpurea* in air-lift bioreactor systems. *Biochemical Engineering Journal*, 132: 206–216.
- Wu SQ, Lian ML, Gao R, Park SY, Piao XC (2011) Bioreactor application on adventitious root culture of *Astragalus membranaceus*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 47: 719–724.
- Yin S, Zhang Y, Gao W, Wang J, Man S, Liu H (2014) Effects of nitrogen source and phosphate concentration on biomass and metabolites accumulation in adventitious root culture of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 915–921.
- Yoeup PK, Chakrabarty D (2003) Micropropagation of woody plants using bioreactor, in: *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, 735–755.
- Zobayed SMA (2008) Aeration in plant tissue culture, in: *Plan Tissue Culture Engineering*. Springer, 313–327.