

## بررسی اثرات مقدار اینوکلوم و سرعت هوادهی بر تولید بیوماس و اسید شیکوریک در کشت ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در بیوراکتور ستون حباب‌دار

فتح‌الله احمدی<sup>۱</sup>، احمد معینی<sup>۲\*</sup> و سجاد رشیدی منفرد<sup>۳</sup>

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پست الکترونیک: moieni\_a@modares.ac.ir

۳- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۴

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۳

### چکیده

در این پژوهش، ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در بیوراکتور ستون حباب‌دار ۱۰۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت WPM مایع کشت و تأثیر مقادیر اینوکلوم (۳، ۶ و  $9\text{g l}^{-1}$ ) و سرعت‌های هوادهی (۱/۰، ۲/۰ و  $4\text{vvm}$ ) روی میزان تولید بیوماس و اسید شیکوریک بررسی شدند. صفات وزن تر، وزن خشک و مقدار اسید شیکوریک ریشه‌های مویین بعد از ۳۰ روز اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار بیوماس ( $16/4\text{g l}^{-1}$  وزن تر و  $2/084\text{g l}^{-1}$  وزن خشک) و اسید شیکوریک ( $16/74\text{mg g}^{-1}\text{DW}$ ) در مقدار اینوکلوم  $6\text{g l}^{-1}$  تولید شده است. نتایج حاصل از بررسی اثر سرعت هوادهی بر تولید بیوماس و اسید شیکوریک نیز نشان داد که بیشترین میزان تولید وزن تر ( $15/4\text{g l}^{-1}$ ) و وزن خشک ( $2/467\text{g l}^{-1}$ ) در سرعت هوادهی  $0/4\text{vvm}$  و بیشترین میزان تولید اسید شیکوریک ( $12/74\text{mg g}^{-1}\text{DW}$ ) در سرعت هوادهی  $0/2\text{vvm}$  بدست آمده است. به‌طور کلی مقدار اینوکلوم و سرعت هوادهی نقش مهمی در میزان رشد و نمو ریشه‌های مویین در بیوراکتور ستون حباب‌دار داشتند و برای بهینه کردن تولید بیوماس و متابولیت ثانویه باید به این عوامل توجه کرد.

واژه‌های کلیدی: سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)، متابولیت ثانویه، گیاه دارویی، کشت درون شیشه‌ای.

### مقدمه

جهانی پیدا کرده‌است و یکی از پرفروش‌ترین گیاهان دارویی در بیشتر کشورهای توسعه یافته است (Kayser & Quax, 2007). عصاره این گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدقارچی دارد. اسید شیکوریک به‌عنوان یکی از مهمترین مواد مؤثره این گیاه، دارای خواص دارویی متعددی مانند خاصیت ضدسرطانی، ضدچاقی، ضدویروسی، ضددیابت و آنتی‌اکسیدانی برای انسان است و ضمناً با توجه به نقش آن

گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)، با تعداد کروموزوم  $2n=2x=22$ ، یک گیاه دارویی علفی، چندساله و متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) و بومی آمریکای شمالی است که به‌طور وسیع در بیشتر نقاط دنیا برای اهداف تجاری کشت می‌شود (Jeong et al., 2009). این گیاه در سال‌های اخیر، به دلیل نقش تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی محبوبیت

تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین است (Baque *et al.*, 2012). بیوراکتورها، به‌طور معمول، شامل یک مخزن با شرایط استریل و حاوی محیط کشت مایع و مجهز به سیستم ورود و خروج هوا هستند (Paek *et al.*, 2005). بیوراکتور ستون حباب‌دار از یک ظرف استوانه‌ای تشکیل شده که یک پخش‌کننده هوا در کف آن قرار دارد که هوا یا مخلوطی از گازها را در محیط کشت برای دو هدف یعنی هوادهی و اختلاط محیط کشت مایع آزاد می‌کند (Choi *et al.*, 2006). تأمین اکسیژن، اختلاط و گردش محیط کشت مایع از مهمترین محدودیت‌های طراحی بیوراکتور و افزایش حجم کشت محسوب می‌شود (Eibl & Eibl, 2008) که باید به‌منظور کنترل مورفولوژی گیاهی و رشد بیوماس و تولید متابولیت‌های ثانویه در بیوراکتور، کنترل شوند (Yesil Celiktas *et al.*, 2010). از طریق بهینه کردن عوامل مختلف می‌توان تولید بیوماس و متابولیت ثانویه در این نوع بیوراکتور را بهبود بخشید. به‌عنوان مثال، تولید آلکالوئیدها در ریشه‌های مویین گیاه *Scopolia parviflora* در بیوراکتور ستون حباب‌دار از طریق بهینه کردن مدت زمان رشد، مقدار اینوکولوم اولیه و میزان هوادهی افزایش یافته است (Min *et al.*, 2007).

به‌دلیل خواص دارویی ارزشمند گیاه سرخارگل و ارزش اقتصادی بالای آن، دستیابی به راهکارهایی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه آن حائز اهمیت می‌باشد. از این‌رو در این پژوهش، کشت ریشه‌های مویین این گیاه در یک بیوراکتور ستون حباب‌دار انجام شد تا ضمن بررسی تولید ریشه‌های مویین در این سیستم، اثرات مقدار اینوکولوم و سرعت هوادهی نیز بر تولید بیوماس و اسید شیکوریک بررسی شوند.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

در این تحقیق از ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) که از تلقیح ریزنمونه‌های برگ‌ی با آگروباکتیوم رایزوتنز سویه A<sub>4</sub> در شرایط آزمایشگاهی تولید (القاه) شده بودند (Abdoli *et al.*, 2013) به‌عنوان مواد گیاهی اولیه برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد. ریشه‌های مویین القاه

در مهار آنزیم HIV intergrase، فعالیت ضدویروس ایدز (HIV) نیز برای آن گزارش شده‌است (Lee & Scagel, 2013)؛ (Schlernitzauer *et al.*, 2013). این ماده در ریشه و اندام هوایی گیاه سرخارگل تولید می‌شود. تولید اقتصادی این گیاه به دلیل عواملی از جمله آلودگی مواد گیاهی با حشرات، قارچ‌ها، باکتری‌ها، تفاوت در میزان ترکیب‌های فعال از گیاهی به گیاه دیگر و نیز از سالی به سال دیگر، طولانی بودن دوره رشد و نیز مشکلات برداشت ریشه، با مشکل مواجه می‌باشد (Romero *et al.*, 2009). بنابراین استفاده از راهکارهای جایگزین برای تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه ضروری به نظر می‌رسد. کشت ریشه‌های مویین، به‌دلیل سرعت رشد زیاد و نامحدود، کوتاه بودن زمان دوربرابر شدن، عدم نیاز به محیط کشت حاوی هورمون و نور، پایداری ژنتیکی بالا و امکان تولید محصولات با ارزش در زمان کم با بازده زیاد، به‌عنوان سیستم بسیار امیدبخش برای تولید متابولیت‌های ثانویه ریشه‌ای در شرایط درون شیشه‌ای مطرح شده است (Banerjee *et al.*, 1998)؛ (Sivakumar, 2006; Kittipongpatana *et al.*, 1998). ویژگی‌های منحصر به فرد این روش، تولید پایدار و قابلیت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است و یک منبع دائمی برای تولید مواد فعال گیاهی محسوب می‌شود (Bourgau *et al.*, 2001). حتی در مواردی که متابولیت‌های ثانویه فقط در قسمت‌های هوایی یک گیاه تجمع می‌یابند، کشت ریشه‌های مویین قادر به سنتز و تجمع آن متابولیت‌ها نیز می‌باشد (Liu *et al.*, 1999; Bakkali *et al.*, 1997). تحقیقات مختلفی روی القای ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل انجام شده (Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006) و تأثیر عوامل مختلف بر تولید بیوماس و متابولیت‌های ثانویه در سیستم ارلن مایر مطالعه شده‌است (Liu; Abbasi *et al.*, 2012; Abbasi *et al.*, 2007)؛ (Abdoli *et al.*, 2013) ولی فقط یک گزارش در مورد کشت ریشه‌های مویین این گیاه در بیوراکتور وجود دارد که در آن ریشه‌های مویین در بیوراکتور هوا بالابر تغییر یافته (Modified Air-lift Bioreactor) کشت شده‌اند (Abdoli *et al.*, 2009).

تولید انبوه بیوماس در بیوراکتورها، یک چالش کلیدی برای

با حجم یک لیتر برای کشت ریشه‌های موین گیاه سرخارگل استفاده گردید. این بیوراکتورها با استفاده از ظروف شیشه‌ای استوانه‌ای (به ارتفاع ۱۵cm و قطر ۹cm) با حجم یک لیتر به‌عنوان مخزن بیوراکتور و شیلنگ‌های سیلیکونی (با قطر داخلی ۵mm) برای هوادهی کشت‌ها، ساخته شدند. برای ساخت بیوراکتور، منافذی در درب پلاستیکی ظروف شیشه‌ای ایجاد شد و بعد شیلنگ‌های سیلیکونی برای انجام هوادهی و همچنین خروج هوای اضافی از بیوراکتور، از این منافذ عبور داده شدند (شکل ۱). شیلنگ حامل جریان هوا برای انجام هوادهی در کف ظرف قرار گرفت و برای ایجاد حباب‌های ریز هوا، در انتهای آن از یک سر سمپلر ۱ میلی‌لیتری مشبک استفاده شد. هوای اضافی از طریق شیلنگ دیگر از بیوراکتور خارج گردید. برای تأمین هوادهی مورد نیاز از پمپ هوای آکواریم استفاده گردید و برای تنظیم سرعت هوادهی از وسیله اندازه‌گیری جریان هوا (Air flow meter) استفاده شد. در مسیر ورودی هوا به بیوراکتور و خروجی آن، از فیلتر  $0.22\mu\text{m}$  برای استریل کردن جریان هوا استفاده شد. برای کشت ریشه‌های موین، بیوراکتور به اندازه نصف حجم خود ( $500$  میلی‌لیتر) از محیط کشت مایع استریل پر شد.

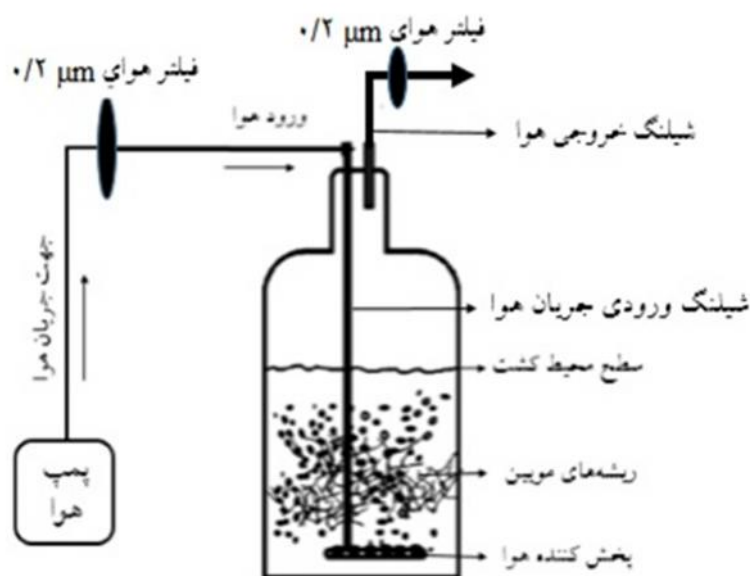
شده در ارلن‌های  $100$  میلی‌لیتری حاوی  $50$  میلی‌لیتر محیط کشت WPM مایع روی شیکر ( $110\text{rpm}$ ) نگهداری می‌شدند. این ریشه‌ها حدود دو سال سن داشتند و طی این مدت در فواصل یک‌ماهه زیر کشت می‌شدند. این تحقیق در سال ۱۳۹۲ در آزمایشگاه کشت سلول و بافت گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

تکثیر ریشه‌های موین برای تهیه مواد گیاهی مورد نیاز برای کشت در بیوراکتور

برای این منظور ریشه‌های موین در ارلن‌های  $100$  و  $250$  میلی‌لیتری، به ترتیب حاوی  $50$  و  $125$  میلی‌لیتر محیط کشت WPM مایع، کشت شدند و در شرایط تاریکی و دمای  $25^\circ\text{C}$  و روی شیکر با دور  $110\text{rpm}$  قرار گرفتند و برای افزایش مقدار ریشه‌های موین، زیر کشت‌های (Subculture) متوالی در فواصل زمانی ۲۱ روزه انجام شد.

ساخت بیوراکتور ستون حباب‌دار و کشت ریشه‌های موین در آن

در این پژوهش از بیوراکتورهای ستون حباب‌دار دست‌ساز



شکل ۱- بیوراکتور ستون حباب‌دار

خشک آنها اندازه‌گیری شد (Abdoli et al., 2013).

#### شاخص رشد

برای تعیین شاخص رشد از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{شاخص رشد} =$$

وزن خشک اولیه / (وزن خشک اولیه - وزن خشک نهایی)  
وزن خشک اولیه همان وزن خشک اینوکولوم بوده و وزن خشک نهایی، از طریق خشک کردن ریشه‌های موپین برداشت شده در انتهای دوره رشد بدست آمد.

#### حجم نهایی محیط کشت مایع داخل بیوراکتور

مقدار محیط کشت مایع داخل بیوراکتور در انتهای دوره رشد تا حدودی کاهش می‌یافت و این مقدار کاهش با سرعت هوادهی در ارتباط بود، از این رو حجم نهایی محیط کشت اندازه‌گیری شده و درصد کاهش آن محاسبه گردید.

#### مقدار اسید شیکوریک

برای عصاره‌گیری از ریشه‌های موپین گیاه سرخارگل، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول متانول و اسید فسفریک ۰/۱٪ (۷۰:۳۰v/v) روی پودر خشک ریشه‌های موپین در ویال‌های ۲ میلی‌لیتر ریخته شد و بعد محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه حمام اولتراسونیک (Ultrasonic bath) قرار گرفت. در مرحله بعد، به مدت ۵min با سرعت ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ انجام شده و محلول روشنوار (Supernatant) برای سنجش مقدار اسید شیکوریک برداشته شد.

برای اندازه‌گیری مقدار اسید شیکوریک در ریشه‌های موپین گیاه سرخارگل، مقدار ۵۰μl از عصاره استخراج شده، به صورت دستی به دستگاه HPLC مدل Waters با ستون C18 (4.6×250mm) تزریق شد. فاز متحرک برای دستگاه به صورت ایزوکراتیک (Isocratic) (ثابت بودن نسبت حلال‌ها در طول زمان) شامل ۳۰٪ (v/v) استونیتریل و ۷۰٪ (v/v) آب حاوی اسید فسفریک ۰/۱٪ با سرعت جریان (Flow Rate) ۱/۷۵ml min<sup>-1</sup> تنظیم شد و از

بررسی تأثیر مقدار اینوکولوم بر تولید بیوماس و اسید شیکوریک در ریشه‌های موپین گیاه سرخارگل با استفاده از بیوراکتور ستون حباب‌دار

برای تعیین میزان اینوکولوم مناسب جهت تولید بیوماس و اسید شیکوریک، سه وزن مختلف از ریشه‌های موپین (۳، ۶ و ۹g I<sup>-1</sup>) در بیوراکتور ستون حباب‌دار ساخته شده، کشت شد. محیط کشت مورد استفاده شامل WPM (Woody Plant Medium) حاوی ۰/۱ mg I<sup>-1</sup> هورمون IBA (Indole-3-Butyric Acid) (Abdoli, 2013) بود و هوادهی با سرعت ۰/۲vvm (Volume of air in Volume of medium per Minute) انجام شد. کشت‌ها به مدت یک ماه در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C قرار گرفتند و بعد از یک ماه، میزان تولید بیوماس ریشه‌های موپین و اسید شیکوریک اندازه‌گیری شدند.

بررسی اثر سرعت هوادهی بر تولید بیوماس و اسید شیکوریک در ریشه‌های موپین گیاه سرخارگل با استفاده از بیوراکتور ستون حباب‌دار

برای این منظور مقدار ۶g I<sup>-1</sup> از ریشه‌های موپین گیاه سرخارگل در بیوراکتورهای ستون حباب‌دار حاوی محیط کشت WPM مایع دارای ۰/۱mg I<sup>-1</sup> هورمون IBA کشت شد و بعد بیوراکتورها با سه سرعت مختلف جریان هوا (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴vvm)، هوادهی شدند. کشت‌ها به مدت یک ماه در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C قرار گرفتند و بعد از یک ماه میزان تولید بیوماس و اسید شیکوریک اندازه‌گیری شدند.

#### صفات مورد مطالعه

##### وزن تر و وزن خشک

برای اندازه‌گیری وزن تر ریشه‌های موپین تولید شده، ابتدا ریشه‌ها با آب مقطر شسته شده و بعد آب سطحی آنها توسط دستمال کاغذی حذف شده و در نهایت وزن تر آنها اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک، ریشه‌های موپین به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰°C و در تاریکی قرار گرفته و بعد وزن

آشکارساز (U.V. (Detector) با طول موج ۳۳۰ nm استفاده شد (Abdoli et al., 2013).

### نتایج

تأثیر میزان اینوکلوم بر تولید بیوماس ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان تولید وزن تر و وزن خشک ریشه‌های مویین در مقدار اینوکلوم ۶ و  $9 \text{ g l}^{-1}$  تفاوت معنی‌داری با هم نداشته، ولی با میزان تولید بیوماس در مقدار اینوکلوم  $3 \text{ g l}^{-1}$  اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ داشته‌اند. مقادیر اینوکلوم ۶ و  $9 \text{ g l}^{-1}$  بیشترین مقدار وزن تر (به ترتیب ۱۶/۴ و  $14/69 \text{ g l}^{-1}$ ) و وزن خشک (به ترتیب ۲/۰۸۴ و  $1/95 \text{ g l}^{-1}$ ) را تولید کردند (جدول ۱).

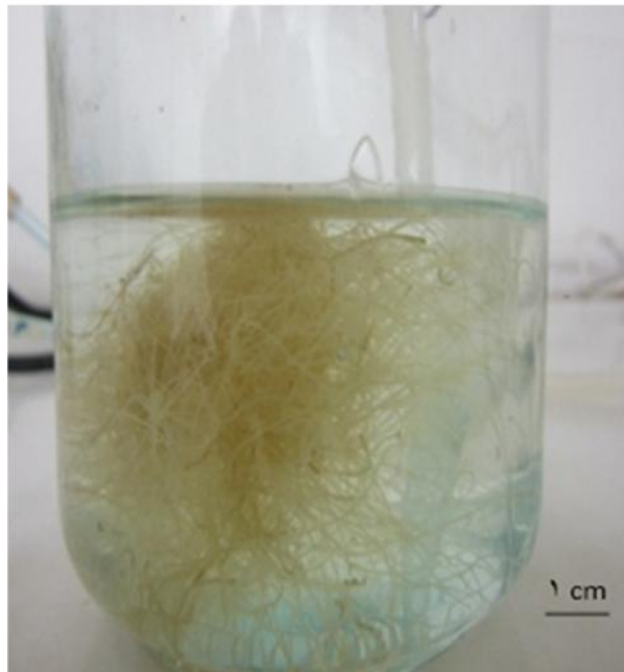
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش‌ها به صورت مستقل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. هر تکرار از یک بیوراکتور ستون حباب‌دار تشکیل گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (Least Significant Difference) (LSD) انجام شد.

جدول ۱- مقایسه میانگین وزن تر، وزن خشک و اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل کشت شده با سطوح مختلف اینوکلوم در بیوراکتور ستون حباب‌دار

مقدار اسید شیکوریک ( $\text{mg g}^{-1} \text{ DW}$ )	شاخص رشد	وزن خشک ( $\text{g l}^{-1}$ )	وزن تر ( $\text{g l}^{-1}$ )	مقدار اینوکلوم ( $\text{g l}^{-1}$ )
$12/92 \pm 1/53 \text{ b}$	$1/137 \pm 0/04 \text{ b}$	$0/641 \pm 0/11 \text{ b}$	$5/93 \pm 1/43 \text{ b}$	۳
$16/74 \pm 2/54 \text{ a}$	$2/475 \pm 0/16 \text{ a}$	$2/084 \pm 0/09 \text{ a}$	$16/4 \pm 0/96 \text{ a}$	۶
$12/42 \pm 3/12 \text{ b}$	$1/167 \pm 0/06 \text{ b}$	$1/95 \pm 0/06 \text{ a}$	$14/69 \pm 0/29 \text{ a}$	۹

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار براساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار است.



شکل ۲- ریشه‌های مویین تولید شده در بیوراکتور ستون حباب‌دار

تأثیر مقادیر مختلف اینوکولوم بر میزان تولید اسید شیکوریک در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل بیشترین میزان تولید اسید شیکوریک ( $16/74 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ) در مقدار اینوکولوم  $6 \text{ g l}^{-1}$  بدست آمد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر سطوح اینوکولوم استفاده شده بود و مقدار اسید شیکوریک تولید شده در مقادیر اینوکولوم ۳ و  $9 \text{ g l}^{-1}$  اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۱).

تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید بیوماس در بیوراکتور ستون حباب‌دار

نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش سرعت هوادهی از  $0/1$  تا  $0/4 \text{ vvm}$ ، میزان تولید وزن تر و وزن خشک افزایش یافته و بیشترین مقدار تولید بیوماس ریشه‌های مویین ( $15/4 \text{ g l}^{-1}$  وزن تر و  $2/467 \text{ g l}^{-1}$  وزن خشک) در سرعت هوادهی  $0/4 \text{ vvm}$  و کمترین میزان تولید ( $9/16 \text{ g l}^{-1}$  وزن تر و  $1/307 \text{ g l}^{-1}$  وزن خشک) در سرعت هوادهی  $0/1 \text{ vvm}$  بدست آمده است. میزان تولید وزن تر و وزن خشک در دو سرعت هوادهی  $0/2 \text{ vvm}$  و  $0/4 \text{ vvm}$  اختلاف معنی‌دار آماری باهم نداشتند (جدول ۲).

تأثیر میزان اینوکولوم بر شاخص رشد ریشه‌های مویین در بیوراکتور ستون حباب‌دار

در این آزمایش مقادیر مختلفی از ریشه‌های مویین (۳، ۶ و  $9 \text{ g l}^{-1}$ ) به‌عنوان اینوکولوم استفاده شده‌است، از این‌رو ممکن است که اختلاف مشاهده شده در میزان تولید وزن تر و وزن خشک در سطوح مختلف اینوکولوم، ناشی از هم‌پایه عامل (وزن اولیه متفاوت ریشه‌های مویین کشت شده) باشد؛ در نتیجه این دو صفت ممکن است نتوانند تأثیر واقعی مقدار اینوکولوم را بر رشد و نمو ریشه‌های مویین (تولید بیوماس) نشان دهند. بنابراین برای بررسی بهتر تأثیر مقدار اینوکولوم بر رشد ریشه‌های مویین، شاخص رشد محاسبه گردید که این شاخص، مقدار رشد واقعی را نشان می‌دهد. مقایسه میانگین شاخص‌های رشد در سطوح مختلف اینوکولوم نشان داد که شاخص رشد در مقدار اینوکولوم  $6 \text{ g l}^{-1}$  به‌طور معنی‌داری بیشتر از دو سطح دیگر بوده است (جدول ۱). در حقیقت استفاده از مقدار اینوکولوم  $6 \text{ g l}^{-1}$ ، برای تولید بیوماس بیشتر در کشت ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل مناسب‌تر بود. تصویری از ریشه‌های مویین تولید شده در بیوراکتور ستون حباب‌دار در شکل ۲ دیده می‌شود.

جدول ۲- تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید وزن تر، وزن خشک و اسید شیکوریک

در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل

مقدار اسید شیکوریک ( $\text{mg g}^{-1} \text{ DW}$ )	کاهش حجم محیط کشت (%)	وزن خشک (g)	وزن تر (g)	سرعت هوادهی (vvm)
$11/87 \pm 0/49 \text{ a}$	$2/22 \pm 2/2 \text{ a}$	$1/307 \pm 0/117 \text{ b}$	$9/16 \pm 0/29 \text{ b}$	$0/1$
$12/74 \pm 0/28 \text{ a}$	$8/3 \pm 1/5 \text{ a}$	$1/98 \pm 0/117 \text{ a}$	$14/33 \pm 1/11 \text{ a}$	$0/2$
$4/56 \pm 1/04 \text{ b}$	$38/3 \pm 6/7 \text{ b}$	$2/467 \pm 0/46 \text{ a}$	$15/44 \pm 1/34 \text{ a}$	$0/4$

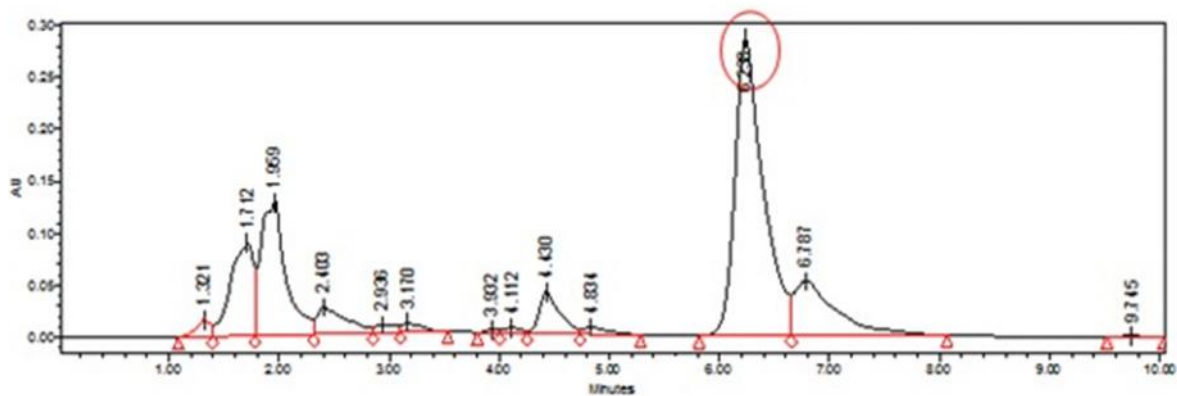
حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار براساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار است.

مشخص شد که میزان کاهش حجم محیط کشت در سرعت هوادهی  $0/4 \text{ vvm}$  ( $3/38\%$ ) نسبت به سرعت‌های هوادهی  $0/2 \text{ vvm}$  ( $3/8\%$ ) و  $0/1 \text{ vvm}$  ( $2/2\%$ ) بیشتر بوده است (جدول ۲).

تأثیر سرعت هوادهی بر میزان کاهش حجم محیط کشت در انتهای دوره رشد ریشه‌های مویین

در این آزمایش حجم محیط کشت مایع داخل بیوراکتور در انتهای دوره رشد ریشه‌های مویین اندازه‌گیری شد و

به ترتیب  $11/87 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  و  $12/74 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشته اما به طور معنی‌داری بیشتر از مقدار تولید آن در سرعت هوادهی  $0/4 \text{vvm}$  ( $4/56 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ) بوده است (جدول ۲). در شکل ۳ کروماتوگرام HPLC اسید شیکوریک تولید شده در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل آورده شده است.



شکل ۳- کروماتوگرام HPLC اسید شیکوریک تولید شده در ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل

مطابقت دارد (Cui *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2009). در صورتی که مقدار اینوکلوم بیشتری کشت شود رشد نهایی ریشه‌های مویین کم می‌شود، زیرا در این شرایط، دسترسی به مواد مغذی و اکسیژن محدود بوده و ریشه‌ها زودتر به فاز ساکن (Stationary phase) رشد می‌رسند، در نتیجه میزان تولید تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در مطالعه‌ای مشخص شد که در مقدار اینوکلوم کم، ریشه‌های مویین در هر نوع بیوراکتور فاز مایع می‌توانند رشد بهتری داشته باشند اما در مقادیر بالاتر، رشد و نمو ریشه‌های مویین محدود می‌شود (Curtis, 2000). در بیوراکتورهای ستون حباب‌دار، به علت الگوی نامشخص جریان هوا، محیط کشت مایع اختلاط ناهمگنی دارد و ریشه‌های مویین کشت شده در این بیوراکتور در همدیگر پیچ خورده و تشکیل توده کروی شکل متراکم می‌دهند، در نتیجه رسیدن اکسیژن و محیط کشت مایع به داخل این توده محدود می‌شود، از این رو در کشت‌های با مقدار اینوکلوم بیشتر، بیوراکتورهای نوع ستون حباب‌دار با

## بحث

تأثیر میزان اینوکلوم بر رشد ریشه‌های مویین گیاه سرخارگل در بیوراکتور ستون حباب‌دار یکی از فاکتورهای مؤثر در تولید بهینه بیوماس در کشت‌های درون شیشه‌ای مقدار اینوکلوم می‌باشد (Lee & Shuler, 2000; Huang *et al.*, 2004). در این مطالعه مشخص شد که مقدار اولیه ریشه‌های مویین کشت شده نقش مهمی در رشد و نمو بعدی آنها دارد و بیشترین میزان تولید بیوماس (وزن تر و وزن خشک به ترتیب  $16/4 \text{ g l}^{-1}$  و  $2/0849 \text{ g l}^{-1}$ ) و همچنین بیشترین مقدار شاخص رشد زمانی بدست آمد که در ابتدای کشت، مقدار  $6 \text{ g l}^{-1}$  از ریشه‌های مویین در بیوراکتور کشت شده بود. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که در مقدار اینوکلوم مناسب برای تولید بیوماس، مقدار اسید شیکوریک بیشتری نیز تولید می‌شود که با نتایج مطالعات انجام شده روی ریشه‌های نابجای گیاهان *Echinacea purpurea* و *Hypericum perforatum*

سلول‌ها و بقایای سلولی (Cell debris) به دیواره ظرف بیوراکتور شده و همچنین موجب تشکیل لایه‌ای در سطح ریشه‌های مویین شده که از رسیدن اکسیژن و مواد مغذی به ریشه‌ها جلوگیری کرده، در نتیجه شرایط کشت همگن را مختل می‌کند و در نهایت باعث کاهش تولید بیوماس می‌گردد و به همین دلیل توجه قابل ملاحظه‌ای را در تحقیقات به خود اختصاص داده‌است (Kino-Oka *et al.*, 1999؛ Yesil-Celiktas *et al.*, 2010). در این آزمایش نیز با افزایش سرعت هوادهی از ۰/۱ تا ۰/۲vvm، ابتدا میزان رشد ریشه‌های مویین بیشتر شد، اما بعد از آن، افزایش معنی‌داری در میزان رشد ریشه‌های مویین مشاهده نشد. علت عدم وجود تفاوت معنی‌دار در میزان تولید وزن تر و وزن خشک ریشه‌های مویین در سرعت هوادهی ۰/۴vvm نسبت به ۰/۲vvm، می‌تواند کاهش مقداری از محیط کشت مایع به علت خروج آن همراه با هوایی که از بیوراکتور خارج می‌شود، باشد. البته در سرعت هوادهی ۰/۴vvm، مقدار محیط کشت مایع داخل بیوراکتور نسبت به هوادهی ۰/۲vvm کاهش یافته بود. در واقع، در سرعت هوادهی ۰/۴vvm، به‌رغم وجود اکسیژن فراوان، کاهش حجم محیط کشت منجر به کاهش رشد و نمو ریشه‌های مویین شده بود. کاهش مقدار محیط کشت، از یک طرف باعث تغییر غلظت عناصر محیط کشت شده که ممکن است برای رشد ریشه‌های مویین مناسب نباشد (Murthy *et al.*, 2014) و از طرف دیگر، از آنجا که در بیوراکتورهای فاز مایع، ریشه‌ها به‌صورت غوطه‌ور در محیط کشت مایع هستند، از این‌رو با کاهش مقدار محیط کشت مایع، تراکم ریشه‌های مویین در واحد حجم محیط کشت مایع بیشتر شده، در نتیجه دسترسی ریشه‌ها به فضای کافی برای دریافت اکسیژن و مواد مغذی کاهش پیدا می‌کند. همچنین سرعت بالای هوادهی ممکن است منجر به خروج CO<sub>2</sub> و نیز برخی مواد فرار از بیوراکتور گردد که ممکن است در رشد و نمو ریشه‌های مویین مؤثر باشند. CO<sub>2</sub> به‌عنوان یک عامل افزایش رشد ریشه‌ها از طریق کاهش فاز تأخیر شناخته شده‌است (Weathers *et al.*, 1999). همچنین، سرعت هوادهی بالا و

کاهش عملکرد مواجه هستند (Kwok & Doran, 1995). همچنین در کشت‌های با میزان بیوماس بالا، ممکن است که حباب‌های هوا به هم پیوسته و باعث کاهش سطح تماس گاز-مایع شوند (Huang & McDonald, 2012). به‌طور کلی، توسعه تکنیک‌ها و راهکارهای مناسب برای توزیع یکنواخت اینوکولوم ریشه‌ای، در مقیاس وسیع در داخل بیوراکتور، با مشکلات زیادی مواجه است (Ramakrishnan *et al.*, 1994).

تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید بیوماس در بیوراکتور ستون حباب‌دار

عواملی که روی انتقال مؤثر اکسیژن به ریشه‌های مویین در بیوراکتور مؤثر هستند، باید در طراحی بیوراکتور برای تولید متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی قرار گیرند (Chattopadhyay *et al.*, 2002). هوادهی مناسب یکی از عوامل مؤثر در کشت ریشه‌های مویین در بیوراکتورها است که در تأمین اکسیژن برای بافت گیاهی دخالت دارد. در بیوراکتورهای ستون حباب‌دار، علاوه بر تأمین اکسیژن مورد نیاز، اختلاط و همگنی محیط کشت مایع نیز توسط هوادهی انجام می‌شود. در نتیجه، در سرعت‌های هوادهی پایین، نه تنها اکسیژن کافی برای مصرف ریشه‌ها تأمین نمی‌شود بلکه اختلاط و همگنی محیط کشت مایع نیز به‌طور ضعیف انجام می‌گردد. بنابراین، میزان رشد در سرعت‌های هوادهی پایین کمتر خواهد بود (Choi *et al.*, 2006).

افزایش جریان هوا در بیوراکتور ستون حباب‌دار باعث افزایش اکسیژن محلول در محیط کشت شده که منجر به افزایش رشد ریشه‌های مویین می‌شود، اما افزایش بیشتر سرعت هوادهی، باعث افزایش تنش برشی (نیروی وارد بر سطح ریشه از طرف جریان مایع) نیز می‌شود. تنش برشی یکی از موانع کشت سلول و بافت گیاهی در مقیاس بالا محسوب می‌شود، زیرا به سلول و بافت گیاهی آسیب زده و باعث شکستن دیواره سلولی و در نتیجه تجمع بقایای سلولی می‌شود. تجمع بقایای سلولی و سلول‌های مرده منجر به ایجاد کف در بیوراکتور می‌شود که این امر باعث چسبیدن



ناشی از عواملی مانند تنش‌های مکانیکی وارد شده به ریشه‌های موپین، کاهش حجم محیط کشت و در نتیجه تغییر غلظت ترکیب‌های محیط کشت و نیز خروج گازها و مواد فرار تولید شده توسط ریشه‌های موپین باشد که در تولید متابولیت‌های ثانویه مؤثرند (Weathers *et al.*, 1999).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت، کشت در بیوراکتور مرحله اساسی برای تولید ریشه‌های موپین در حجم زیاد می‌باشد. بهینه کردن شرایط تولید ریشه‌های موپین برای افزایش بیوماس و مقدار مواد مؤثره در بیوراکتور امری ضروریست. میزان اینوکولوم اولیه و سرعت هوادهی از مهمترین عواملی هستند که در توسعه بیوراکتور برای کشت ریشه‌های موپین باید مورد توجه قرار گیرند. در این پژوهش مشخص شد که مقدار اینوکولوم  $6 \text{ g l}^{-1}$  و سرعت هوادهی  $0.2 \text{ vvm}$  برای تولید بیوماس و اسید شیکوریک در ریشه‌های موپین گیاه سرخارگل در بیوراکتور ستون حباب‌دار مناسب هستند و می‌توان از یافته‌های این پژوهش، برای تولید بیوماس مناسب و اسید شیکوریک در ریشه‌های موپین گیاه سرخارگل در بیوراکتور ستون حباب‌دار ساخته شده در این پژوهش استفاده کرد.

#### منابع مورد استفاده

- Abbasi, B.H., Liu, R., Saxena, P. and Liu, C.Z., 2009. Cichoric acid production from hairy root cultures of *Echinacea purpurea* grown in a modified airlift bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(11): 1697-1701.
- Abbasi, B.H., Stiles, A.R., Saxena, P.K. and Liu, C.Z., 2012. Gibberellic acid increases secondary metabolite production in *Echinacea purpurea* hairy roots. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(7): 2057-2066.
- Abbasi, B.H., Tian, C.L., Murch, S.J., Saxena, P.K. and Liu, C.Z., 2007. Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Reports*, 26(8): 1367-1372.
- Abdoli, M., 2013. Study on Cichoric acid production via optimization of hairy roots culture and polyploidy induction in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Ph.D thesis, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of

در نتیجه اختلاط و گردش شدید محیط کشت مایع، منجر به آسیب برشی و شکستن دیواره سلولی و در نتیجه تجمع بقایای سلولی می‌شود. تجمع بقایای سلولی و سلول‌های مرده منجر به ایجاد کف در بیوراکتور می‌شود که این امر باعث چسبیدن این مواد در دیواره ظرف کشت شده و از طرف دیگر باعث تشکیل لایه‌ای در سطح ریشه‌های موپین شده که می‌تواند از رسیدن اکسیژن و مواد مغذی به ریشه‌ها جلوگیری کرده، در نتیجه شرایط کشت همگن را مختل کند (Yesil Celiktas *et al.*, 2010).

تأثیر سرعت هوادهی بر میزان کاهش محیط کشت مایع سرعت نسبتاً بالای هوادهی به مرور زمان باعث خروج رطوبت داخل بیوراکتور می‌شود. در حقیقت، هوای ورودی به داخل بیوراکتور میزان رطوبت پایینی داشته، ولی هوای خروجی به علت عبور از محیط کشت مایع، مقداری از رطوبت محیط کشت مایع داخل بیوراکتور را جذب کرده، در نتیجه مقدار رطوبت بالایی دارد و این عامل باعث کاهش حجم محیط کشت مایع در سرعت‌های هوادهی بالا شده‌است.

#### تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید اسید شیکوریک

مطالعات انجام شده روی تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه نشان داده‌است که میزان تولید متابولیت با افزایش سرعت هوادهی کاهش می‌یابد، به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای روی ریشه‌های نابجای گیاه سرخارگل مشخص شده‌است که میزان تولید اسید شیکوریک، با افزایش سرعت هوادهی از  $0.1 \text{ vvm}$  تا  $0.3 \text{ vvm}$  کاهش می‌یابد (Jeong *et al.*, 2009). نتایج این آزمایش نشان داد که رابطه مستقیمی بین میزان تولید اسید شیکوریک و محیط کشت باقیمانده در بیوراکتور وجود دارد، به‌طوری که با کاهش حجم محیط کشت مایع در سرعت‌های بالای هوادهی، میزان تولید اسید شیکوریک به‌شدت کاهش یافت. با توجه به مطالب فوق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تولید کمتر اسید شیکوریک در سرعت‌های بالای هوادهی می‌تواند

- 30(2): 398-409.
- Jeong, J.A., Wu, C.H., Murthy, H.N., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 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.
  - Kayser, O. and Quax, W.J., 2007. *Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications*. Weinheim, Wiley-VCH Press, 576p.
  - Kino-Oka, M., Hitaka, Y., Taya, M. and Tone, S., 1999. High-density culture of red beet hairy roots by considering medium flow condition in a bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 54(15-16): 3179-3186.
  - Kittipongpatana, N., Hock, R.S. and Porter, J.R., 1998. Production of solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52: 133-143.
  - Kwok, K.H. and Doran, P.M., 1995. Kinetic and stoichiometric analysis of hairy roots in a segmented bubble column reactor. *Biotechnology Progress*, 11(4): 429-435.
  - Lee, C.W. and Shuler, M.L., 2000. The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 67: 61-71.
  - Lee, J. and Scagel, C.F., 2013. Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. *Frontiers in Chemistry*, 1: 1-17.
  - Liu, C.Z., Wang, Y., Zhao, B., Guo, C., Ouyang, F., Ye, H. and Li, G., 1999. Development of a nutrient mist bioreactor for growth of hairy roots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 35: 271-274.
  - Liu, R., Li, W., Sun, L. and Liu, C., 2012. Improving root growth and cichoric acid derivatives production in hairy root culture of *Echinacea purpurea* by ultrasound treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 60: 62-66.
  - Liu, C.Z., Abbasi, B.H., Gao, M., Murch, S.J. and Saxena, P.K., 2006. Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22): 8456-8460.
  - Min, J.Y., Jung, H.Y., Kang, S.M., Kim, Y.D., Kang, Y.M., Park, D.J., Prasad, D.T. and Choi, M.S., 2007. Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots. *Bioresource Technology*, 98: 1748-1753.
  - Murthy, H.N., Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2014. *Agriculture*, Tarbiat Modares University, Iran.
  - Abdoli, M., Moieni A. and Naghdi Badi, H., 2013. Influence of  $KNO_3$ ,  $CaCl_2$  and  $MgSO_4$  concentrations on growth and cichoric acid accumulation in hairy root culture of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 45: 75-84.
  - Bakkali, A.T., Jaziri, M., Foriers, A., Vander Heyden, Y., Vanhaelen, M. and Homes, J. 1997. Lawsone accumulation in normal and transformed cultures of henna, *Lawsonia inermis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51(2): 83-87.
  - Banerjee, S., Rahman, L., Uniyal, G.C. and Ahuja, P.S., 1998. Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy root cultures of *Valeriana wallichii* DC. *Plant Science*, 131(2): 203-208.
  - Baque, M.A., Moh, S.H., Lee, E.J., Zhong, J.J. and Paek, K.Y. 2012. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances*, 30(6): 1255-1267.
  - Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5): 839-851.
  - Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A.K. and Bisaria, V.S., 2002. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7: 138-149.
  - Choi, Y.E., Kim, Y.S. and Paek, K.Y., 2006. Types and designs of bioreactors for hairy root culture. *Plant Tissue Culture Engineering*, 6: 161-172.
  - Cui, X.H., Chakrabarty, D., Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2010. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technology*, 101(12): 4708-4716.
  - Curtis, W.R., 2000. Hairy roots, bioreactor growth: 827-841. Spier, R.E., (Ed.). *Encyclopedia of Cell Technology*. Wiley-Interscience, 1249p.
  - Eibl, R. and Eibl, D., 2008. Design and use of the wave bioreactor for plant cell culture. *Plant Tissue Culture Engineering*, 6: 203-227.
  - Huang, S.Y., Hung, C.H. and Chou, S.N., 2004. Innovative strategies for operation of mist trickling reactors for enhanced hairy root proliferation and secondary metabolite productivity. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 22-32.
  - Huang, T.K. and McDonald, K.A., 2012. Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnology Advances*,

- acid is an antioxidant molecule that stimulates AMP Kinase pathway in L6 Myotubes and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Plos One, 8: 78-88.
- Sivakumar, G., 2006. Bioreactor technology: A novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. Biotechnology Journal, 1: 1419-1427.
  - Wang, B., Zhang, G., Zhu, L., Chen, L. and Zhang, Y., 2006. Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures. Colloids and Surfaces Biointerfaces, 53: 101-104.
  - Weathers, P., Wyslouzil, B., Wobbe, K., Kim, Y. and Yigit, E., 1999. The biological response of hairy roots to O<sub>2</sub> levels in bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35: 286-289.
  - Yesil Celiktas, O., Gurel, A. and Vardar-Sukan, F., 2010. Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. Transworld Research Network, 1-54.
  - Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*: 1-16.
  - Paek, K., Chakrabarty, D. and Hahn, E., 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(3): 287-300.
  - Ramakrishnan, D., Salim, J. and Curtis, W.R., 1994. Inoculation and tissue distribution in pilot-scale plant root culture bioreactors. *Biotechnology Techniques*, 8(9): 639-644.
  - Romero, F.R., Delate, K., Kraus, G.A., Solco, A.K., Murphy, P.A. and Hannapel, D.J., 2009. Alkamide production from hairy root cultures of *Echinacea*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45: 599-609.
  - Schlernitzauer, A., Oiry, C., Hamad, R., Galas, S., Cortade, F., Chabi, B., Casas, F., Pessemesse, L., Fouret, G. and Feillet-Coudraym, C., 2013. Chicoric

## Effects of inoculum density and aeration rate on biomass and cichoric acid production in *Echinacea purpurea* L. hairy roots in bubble column bioreactor

F. Ahmadi<sup>1</sup>, A. Moieni<sup>2\*</sup> and S. Rashidi Monfared<sup>3</sup>

1- MSc., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2\*- Corresponding author, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, E-mail: moieni\_a@modares.ac.ir

3- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: January 2015

Revised: May 2015

Accepted: June 2015

### Abstract

In this research, *Echinacea purpurea* L. hairy roots were cultured in 1000 ml bubble column bioreactor containing 500 ml WPM liquid medium and the effects of inoculum densities (3, 6 and 9g l<sup>-1</sup>) and aeration rates (0.1, 0.2 and 0.4vvm) on biomass and cichoric acid production were investigated. Fresh and dry weights and also the cichoric acid content in hairy roots were measured after 30 days. The results showed that the highest amount of biomass (16.4g l<sup>-1</sup> fresh weight and 2.084g l<sup>-1</sup> dry weight) and cichoric acid (16.74mg g<sup>-1</sup> DW) were produced in the inoculum density of 6 g l<sup>-1</sup>. The investigation of aeration rates on biomass and cichoric acid production showed that the maximum fresh weight (15.4g l<sup>-1</sup>) and dry weight (2.467g l<sup>-1</sup>) were obtained in aeration rate of 0.4vvm and the maximum cichoric acid content (12.74mg g<sup>-1</sup> DW) was obtained in aeration rate of 0.2vvm. Overall, the inoculum density and aeration rate had considerable effects on the hairy root growth and development in bubble column bioreactor and they should be optimized for obtaining the highest hairy root biomass and secondary metabolites.

**Keywords:** *Echinacea purpurea* L., secondary metabolite, medicinal plant, *in vitro* culture.