

بهینه‌سازی تولید تباین از ریشه‌های نابجای خشخاش کبیر (*Papaver bracteatum* Lindle.) با تغییر حجم هوادهی و دمای بیوراکتور

نسرین قوامی^{۱*}، حسنعلی نقدی‌بادی، اردشیر قادری، علی مهرآفرین، فرحناز خلیقی سیگارودی، امیررضا زارع کاریزی

۱- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی کرج، ایران
*آدرس مکاتبه: کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق پستی: ۱۳۶۹-۳۱۳۷۵
تلفن: ۰۲۶-۳۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶)، نمابر: ۰۲۶-۳۴۷۶۴۰۲۱
پست الکترونیک: nassrinqavami@gmail.com

تاریخ تصویب: ۹۷/۱۱/۱

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۱۴

چکیده

مقدمه: امروزه بهینه‌سازی شرایط کشت در بیوراکتورها به عنوان یک راهکار مهم برای تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله تباین بسیار مورد توجه است. تباین، آلکالوئید غالب در گیاه خشخاش ایرانی است که به عنوان ماده اولیه جهت سنتز ترکیبات ضد درد مورد استفاده قرار می‌گیرد.

هدف: بهینه‌سازی شرایط کشت ریشه نابجا خشخاش کبیر در بیوراکتور در راستای افزایش تولید تباین.

روش بررسی: در این آزمایش، ریشه‌های نابجا از ریزنمونه ساقه گیاه به دست آمده و سپس در بیوراکتور ستونی حباب‌دار کشت شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتور دمای بیوراکتور در ۴ سطح شامل ۱۴، ۲۰، ۲۶ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد و همچنین حجم هوادهی بیوراکتور در ۴ سطح (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ vvm) اعمال شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که دما و حجم هوادهی بیوراکتور تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه و میزان تباین آن داشتند. بیشترین وزن خشک ریشه نابجا در هوادهی ۰/۲ vvm و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. بیشترین میزان تباین ریشه نابجا در حجم هوادهی ۰/۲ vvm و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد حاصل شد.

نتیجه‌گیری: حجم هوادهی و دما دو فاکتور مهم در تولید انبوه زیست توده و تباین از ریشه نابجا خشخاش کبیر در بیوراکتور می‌باشد.

کل واژگان: بیوراکتور، تباین، خشخاش کبیر، ریشه نابجا



مقدمه

پژوهش با هدف بهینه‌سازی رشد و تولید ماده تباین از ریشه‌های نابجا گیاه خشخاش کبیر در بیوراکتور انجام شده است.

مواد و روش‌ها

بذر گیاه خشخاش کبیر از بانک بذر پژوهش‌شده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی (با کد MPISB-1328) تهیه شد. منشأ بذرهای مورد استفاده، منطقه انجمنه در کردستان بود. برای استریل نمودن بذرهای گیاه، ابتدا آنها به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد و سپس در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. به منظور حذف هیپوکلریت سدیم، بذرهای ضدعفونی شده، ۵ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرها بعد از ضدعفونی شدن، در محیط MS ۱/۲ کشت و سپس ساقه ۲۱ روزه گیاه خشخاش کبیر برای تولید ریشه نابجا در آن قرار گرفت (شکل شماره ۱). الف). ریشه‌های نابجای تولیدشده در ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع MS حاوی هورمون اکسین کشت شدند (شکل شماره ۱. ب) و در شیکر انکوباتور با ۹۰ (دور در دقیقه)، دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

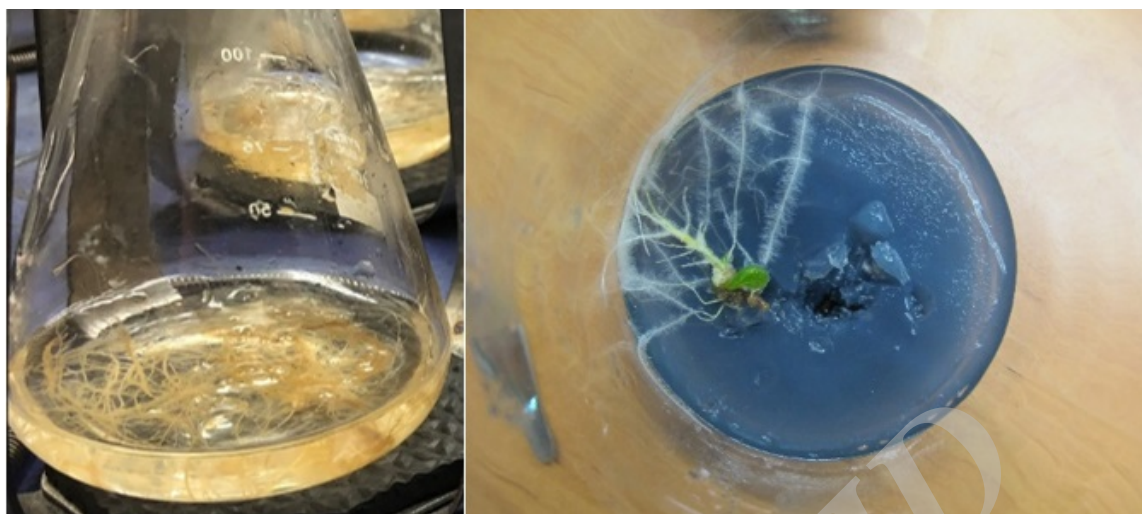
به منظور بررسی اثر حجم هوادهی و دما بر رشد ریشه و تولید تباین، ریشه‌های نابجا خشخاش کبیر در بیوراکتور ستونی حباب‌دار ۲ لیتری حاوی محیط کشت مایع MS کشت شدند (شکل شماره ۲). جهت هوادهی و تولید حباب، در انتهای راکتور یک اسپارژر تعبیه شده بود. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار طراحی شده بود و طی آن اثرات حجم هوادهی در ۴ سطح vvm (Volume air per Volume culture per Minute) ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ و همچنین فاکتور دما در ۴ سطح ۱۴، ۲۰، ۲۶ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. در پایان آزمایش، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با روش چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

خشخاش ایرانی با نام علمی *Papaver bracteatum* Lindl.

یک گیاه چندساله از تیره پاپاوراسه (*Papaveraceae*) است. این گونه اغلب در مراتع کوهستانی ایران در استان‌های مازندران (شیب‌های ارتفاعات البرز)، آذربایجان غربی، کردستان و تهران (دامنه‌های جنوبی دماوند، پلور) پراکنش دارد [۱]. اهمیت ویژه این گونه گیاهی به دلیل دارا بودن مقادیر قابل توجه آلکالوئید ارزشمند تباین می‌باشد که در صنعت داروسازی کاربرد دارد [۵-۲]. تباین از ترکیبات اصلی گیاه خشخاش کبیر (ایرانی) می‌باشد که به راحتی به کدین تبدیل شده و اعتیادآور نیست [۴] و داروهای مورد استفاده در درمان مسمومیت با اپیوئیدها و اعتیاد به آنها، مانند نالوکسون (*Naloxone*)، نالتروکسون (*Naltrexone*) و بوپرنورفین (*Buprenorphine*) از آن ساخته می‌شوند [۵، ۶]. در سال‌های اخیر، تکنولوژی کشت سلول، بافت و اندام گیاهی برای تولید بسیاری از متابولیت‌های دارویی، رنگ‌دانه‌ها و دیگر مواد شیمیایی مفید با موفقیت به کار رفته است. کشت ریشه‌های نابجا روشی کارآمد برای تولید زیست توده گیاهی با سرعت رشد بالا و بهره‌وری پایدار متابولیت‌های با ارزش دارویی، غذایی و صنعتی است [۷]. ریشه‌های نابجا یک نوع ریشه جانبی است که از اندام‌هایی غیر از ریشه مانند ساقه، دم‌برگ و غیره حاصل می‌شود [۸]. تولید ریشه نابجا توسط عوامل متعدد درون‌زا مانند هورمون‌ها، آنزیم‌ها و ترکیبات متابولیک و یا عوامل خارجی مانند درجه حرارت، نور و زخم‌زنی تنظیم می‌شود [۹]. بیوراکتورها اغلب برای تولید در مقیاس زیاد متابولیت‌های گیاهی مناسب هستند، زیرا در آنها شرایط رشد زیست‌توده به صورت خودکار یا نیمه خودکار کنترل شده و در هزینه‌های کار و تولید صرفه‌جویی می‌شود [۱۰].

با توجه به خسارت ناشی از قاچاق مواد مخدر در کشور، محدودیت‌های بین‌المللی کشت خشخاش و نیز انحصاری بودن مجوز کشت آن توسط سازمان ملل برای استفاده‌های دارویی می‌توان به با کارگیری فن‌آوری‌های کشت درون شیشه‌ای (مانند کشت ریشه نابجا در بیوراکتورها)، ماده دارویی ارزشمند تباین را در مقیاس انبوه را تولید و نیاز صنایع دارویی را مرتفع نمود. این





شکل شماره ۱- الف. ریشه نابجای حاصل از ریزنمونه ساقه گیاه خشخاش کبیر ب. کشت ریشه‌های نابجا در محیط کشت مایع



شکل شماره ۲- ریشه‌های نابجای تولید شده در بیوراکتور ستونی حبابدار

اندازه‌گیری تباین

نمونه‌های زیست توده ریشه نابجا بعد از جمع‌آوری از بیوراکتور در آن خشک و سپس پودر شدند. یک گرم از نمونه پودر شده را داخل ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و به آن ۵ میلی‌لیتر آمونیاک ۲۵ درصد، ۲۵ میلی‌لیتر متانول و ۷۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد. ارلن محتوی نمونه و حلال را به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده و بعد از نیم ساعت بوسیله کاغذ صافی صاف شد و محلول صاف شده را به یک بالن ۲۰۰ میلی‌لیتری منتقل و با استفاده از روتاری خشک شد. به رسوبات باقیمانده داخل بالن ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک یک نرمال اضافه شد. این محلول را

به یک دکانتور منتقل کرده و پس از ایجاد دو فاز مجزا، فاز کلروفرمی (فاز پایینی) از دکانتور خارج شد. با استفاده از آمونیاک pH محلول روی ۱۱-۱۰ تنظیم و سپس با ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم عمل استخراج انجام شد. برای آب‌گیری از محلول حاصل، به محلول کلروفرمی جمع‌آوری شده، سدیم سولفات انیدرید اضافه و با دستگاه روتاری نمونه را کاملاً خشک شد. عصاره خشک به دست آمده را در یک میلی‌لیتر متانول حل کرده به نسبت ۱ به ۱۰ جهت تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (*High-performance liquid chromatography*) (HPLC) رقیق شد.

نتایج

بیشترین وزن خشک ریشه ۲/۷ و ۳ گرم به ترتیب در حجم هوادهی ۰/۲ vvm و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل‌های شماره ۱ و ۲). در جدول مقایسه میانگین اثر متقابل بیشترین وزن خشک ریشه ۳/۷ گرم در حجم هوادهی vvm ۰/۲ و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (جدول شماره ۲).

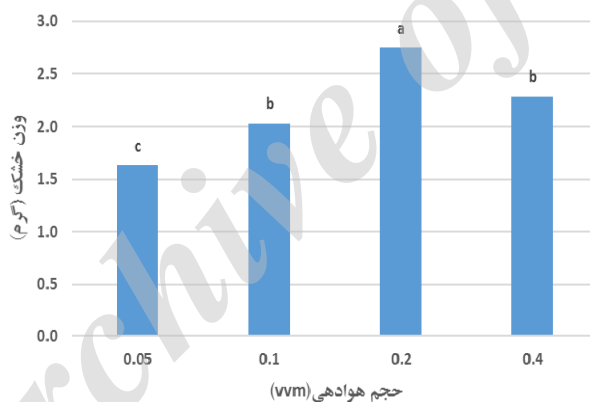
اثر حجم هوادهی و دما بر وزن خشک ریشه نابجا

حجم هوادهی و دما بر وزن خشک ریشه‌های نابجای خشخاش کبیر تولید شده در بیوراکتور تأثیر معنی‌داری ($P \leq 0/01$) داشتند، اما اثر متقابل حجم هوادهی و دما بر وزن خشک ریشه‌های نابجا معنی‌دار نشد (جدول شماره ۱).

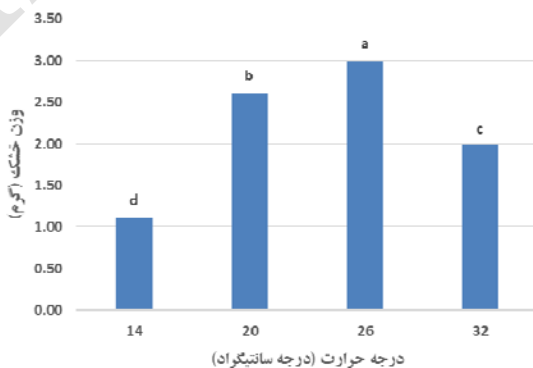
جدول شماره ۱- جدول تجزیه واریانس اثر دما و حجم هوادهی بر صفات مورد ارزیابی ریشه نابجا خشخاش کبیر

منابع تغییر	درجه آزادی	تباین	وزن خشک
دما	۳	۱۱۰/۹۳۷**	۸/۰۲۸**
هوادهی	۳	۶/۱۹۳**	۲/۶۲۵**
دما × هوادهی	۹	۰/۷۷۸ ^{ns}	۰/۱۲۴ ^{ns}
خطا	۳۲	۰/۴۷۶	۰/۱۵۴
ضریب تغییرات		۱۸/۹۷	۱۸/۰۶

** معنی‌دار در سطح یک درصد، ns: عدم معنی‌داری



شکل شماره ۱- مقایسه میانگین اثر حجم هوادهی بر وزن خشک ریشه‌های نابجا خشخاش کبیر ($P \leq 0/05$)



شکل شماره ۲- مقایسه میانگین اثر دما بر وزن خشک ریشه‌های نابجا خشخاش کبیر ($P \leq 0/05$)



هوادهی نشان داد که بیشترین میزان تباین ۸۷۴ میلی‌گرم/گرم در حجم هوادهی ۰/۲ vvm و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (جدول شماره ۲).

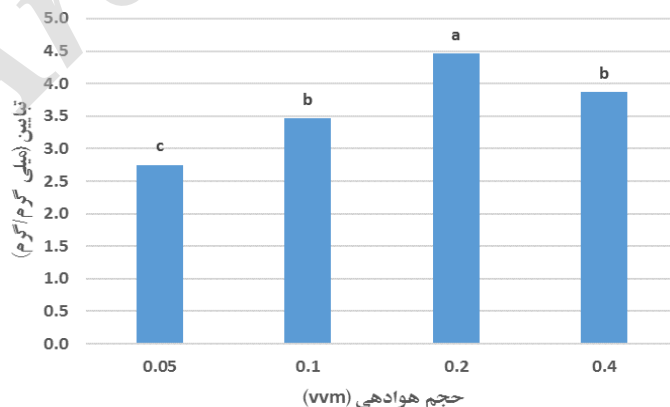
با افزایش دما از ۲۰ به ۲۶ درجه سانتی‌گراد میزان تباین ریشه به طور معنی‌داری افزایش و سپس با افزایش دما به ۳۲ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. به هر حال بیشترین میزان تباین ریشه نابجا در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد (۷/۷ میلی‌گرم/گرم) و کمترین میزان تباین در دمای ۱۴ درجه سانتی‌گراد (۰/۷ میلی‌گرم/گرم) مشاهده شد (شکل شماره ۴). کروماتوگرام HPLC تباین از ریشه نابجا در شکل شماره ۵ آمده است.

اثر حجم هوادهی و دما بر میزان تباین ریشه نابجا

اثر حجم هوادهی و دما بر میزان تباین ریشه‌های نابجای خشک‌شده کبیر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود، اما اثر متقابل حجم هوادهی و دما بر تباین ریشه‌های نابجا معنی‌دار نبود (جدول شماره ۱). نتایج نشان داد که با افزایش حجم هوادهی میزان تباین ریشه‌های نابجا افزایش می‌یابد و بالاترین میزان تباین ریشه نابجا در حجم هوادهی ۰/۲ vvm (۴/۴۵ میلی‌گرم/گرم) مشاهده شد (شکل شماره ۳). بیشترین میزان تباین ۷/۷ میلی‌گرم/گرم در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل شماره ۴). جدول مقایسه میانگین اثر متقابل دما و حجم

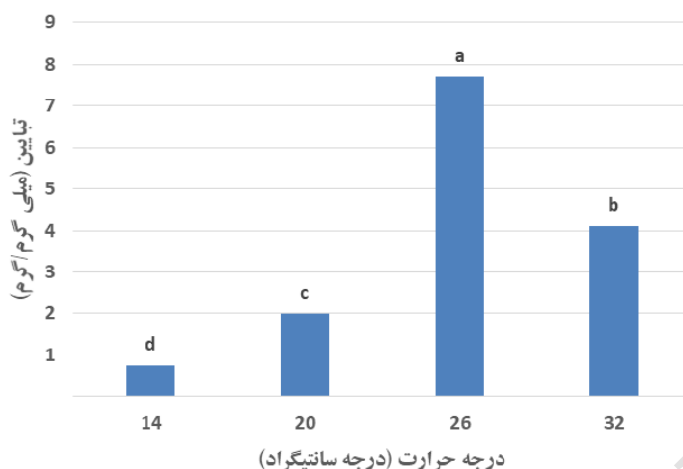
جدول شماره ۲- جدول مقایسه میانگین اثر متقابل دما و حجم هوادهی بر مقدار وزن خشک و تباین ریشه نابجا خشک‌شده کبیر

دما (درجه سانتی‌گراد)	حجم هوادهی (vvm)	تباین (میلی‌گرم/گرم)	وزن خشک (گرم)
۱۴	۰/۰۵	۰/۶۵g	۰/۸۶g
	۰/۱	۰/۷۱g	۱/۰۳g
	۰/۲	۰/۹۱g	۱/۴۴efg
	۰/۴	۰/۷۲g	۱/۱۵fg
۲۰	۰/۰۵	۱/۱۷fg	۱/۸۴def
	۰/۱	۱/۷۳efg	۲/۳۰cd
	۰/۲	۲/۸۲de	۳/۲۸ab
	۰/۴	۲/۲۶def	۲/۹۹bc
۲۶	۰/۰۵	۶/۳۵b	۲/۳۶cd
	۰/۱	۷/۹۴a	۲/۹۶bc
	۰/۲	۸/۷۴a	۳/۷۰a
	۰/۴	۷/۷۶a	۲/۹۶bc
۳۲	۰/۰۵	۲/۸۲de	۱/۴۶efg
	۰/۱	۳/۴۵d	۱/۸۳def
	۰/۲	۵/۳۵bc	۲/۵۶cd
	۰/۴	۴/۷۳c	۲/۰۴de

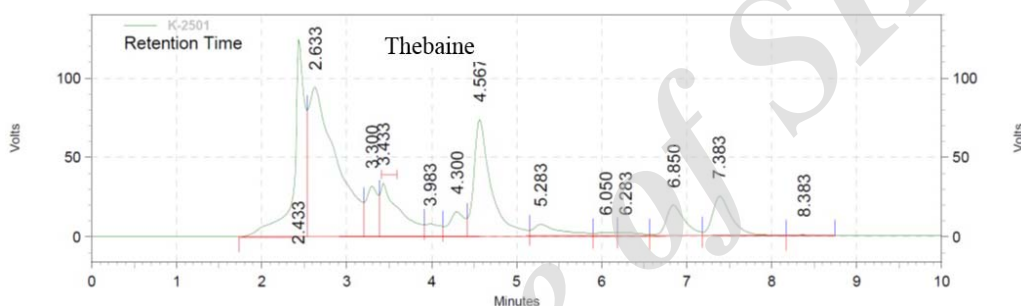


شکل شماره ۳- مقایسه میانگین اثر حجم هوادهی بر میزان تباین ریشه‌های نابجا خشک‌شده کبیر ($P \leq 0.05$)





شکل شماره ۴- مقایسه میانگین اثر دما بر تباین ریشه‌های نابجا خشخاش کبیر ($P \leq 0.05$)



شکل شماره ۵- کروماتوگرام تباین از ریشه نابجا خشخاش کبیر

میزان رشد در سرعت‌های هوادهی پایین کمتر خواهد بود. همچنین سرعت بالای هوادهی ممکن است منجر به خروج CO_2 و نیز برخی مواد فرار از بیوراکتور شود که ممکن است در رشد و نمو ریشه‌های نابجا مؤثر باشند. همچنین، سرعت هوادهی بالا و 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 موئین شده که می‌تواند از رسیدن اکسیژن و مواد مغذی به ریشه‌ها جلوگیری کرده، در نتیجه شرایط کشت همگن را مختل کند [۱۱]. مطالعات انجام شده روی تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه نشان داده است که میزان تولید

بحث

عواملی که روی انتقال اکسیژن به ریشه‌های نابجا در بیوراکتور مؤثر هستند، باید در طراحی بیوراکتور برای تولید متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی قرار گیرند. هوادهی مناسب یکی از عوامل مؤثر در کشت ریشه‌های نابجا در بیوراکتورها است که در تأمین اکسیژن برای بافت گیاهی دخالت دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که حجم هوادهی کمتر و بیشتر از ۰/۲ vvm، برای تولید زیست توده و انباشت متابولیت‌ها مناسب نیست. علت آن ممکن است این باشد که 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 به طور ضعیف انجام می‌شود. بنابراین،



افزایش حجم هوا (۰/۱ vvm) بهبود یافت [۱۵]. تأثیر دمای بر روی رشد ریشه نابجای خشخاش کبیر، پس از حدود ۴ هفته ارزیابی شد. کاهش تشکیل ریشه‌ها در دمای پایین می‌تواند به دلیل تأخیر در روند تقسیم سلولی باشد. در پژوهش حاضر، قرار گرفتن ریشه‌های نابجای خشخاش کبیر در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد موجب افزایش نسبی وزن تر ریشه شد. لی و همکاران (۲۰۰۹) افزایش سرعت رشد ریشه‌های جین‌سینگ را در دمای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد نشان دادند [۱۶]. گزارش شده است که دمای بهینه، جذب اکسین‌های موجود در محیط کشت را افزایش می‌دهد [۱۷، ۱۸].

نتیجه‌گیری

بهینه کردن شرایط تولید ریشه‌های نابجا برای افزایش بیوماس و مقدار مواد مؤثره در بیوراکتور امری ضروریست. سرعت هوادهی یکی از مهم‌ترین عواملی است که در توسعه بیوراکتور برای کشت ریشه‌های نابجا باید مورد توجه قرار گیرند. در این پژوهش مشخص شد که مقدار هوادهی ۰/۲ vvm و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد برای تولید بیوماس و تبیین در ریشه‌های نابجای گیاه خشخاش کبیر در بیوراکتور ستون‌جبابدار مناسب هستند.

متابولیت با افزایش سرعت هوادهی کاهش می‌یابد، به عنوان مثال در مطالعه‌ای روی ریشه‌های نابجای گیاه سرخارگل مشخص شده است که میزان تولید اسید شیکوریک، با افزایش سرعت هوادهی از ۰/۱ vvm تا ۰/۳ vvm کاهش می‌یابد [۱۲]. نتایج این آزمایش نشان داد که تولید کمتر اسید شیکوریک در سرعت‌های بالای هوادهی می‌تواند ناشی از عواملی مانند تنش‌های مکانیکی وارد شده به ریشه‌های مویین، کاهش حجم محیط کشت و در نتیجه تغییر غلظت ترکیب‌های محیط کشت و نیز خروج گازها و مواد فرار تولید شده توسط ریشه‌های مویین باشد که بر تولید متابولیت‌های ثانویه مؤثرند. در کشت ریشه نابجای گیاه جین‌سینگ، بیشترین زیست توده در حجم هوادهی ۰/۱ vvm نسبت به ۰/۰۵ vvm به دست آمد و همراه با افزایش مقدار هوادهی تا ۰/۳ vvm، میزان زیست توده کاهش یافت [۱۳]. در کشت ریشه تاتوره، حجم هوادهی بالاتر از ۰/۱ vvm موجب کاهش قابل توجهی در مقدار تولید متابولیت شد، در حالی که حداکثر رشد و تولید در حجم هوای ۰/۶ vvm به دست آمد [۱۴]. در تحقیقی به منظور بهینه‌سازی سیستم کشت برای تولید هاپیرسین از ریشه نابجا، از بیوراکتورهای بالنی‌جبابدار برای بررسی اثر حجم هوا و دانسیته تلقیح بر قابلیت تولید و محتوای هاپیرسین در طول کشت ریشه نابجا استفاده شد. تولید هاپیرسین با

منابع

1. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names 2012, Iran: Farhang Moaser Press.
2. Fairbairn J W and Hakim F. *Papaver bracteatum* Lindl.—a new plant source of opiates. *J. Pharm. Pharmacol.* 1973; 25: 353–8.
3. Nyman U and Bruhn J G. *Papaver bracteatum* Lindl.-a summary of current knowledge. *Planta Medica.* 1979; 35: 98-117.
4. Kapoor L D. *Opium Poppy: botany, chemistry and pharmacology.* 1997, USA: Food Products Press.
5. Kettenes-van de Bosch J, Salemink J C A and Khan I. Biological activity of the alkaloids of *Papaver bracteatum* Lind. *Journal of Ethnopharmacology* 1981; 3 (1): 21-38.
6. Palevitch D and Levy A. Domestication of *Papaver bracteatum* as a source of thebaine. *Acta Horticulturae.* 1992; 306: 33-52.
7. Murthy H N and Praveen N. Carbon sources and medium pH affects the growth of *Withania somnifera* (L.) Dunal adventitious roots and withanolide A production. *Natural Product Res.* 2008; 27 (2): 185-9.
8. Ramirez-Carvajal G A, Morse A M, Dervinis C and Davis J M. The cytokinin type-B response regulator PtRR13 is a negative regulator of



adventitious root development in *Populus*. *Plant Physiol.* 2009; 150 (2): 759-771.

9. Deepthi S and Satheeshkumar K. Effects of major nutrients, growth regulators and inoculum size on enhanced growth and camptothecin production in adventitious root cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. *Biochemical Engineering J.* 2017; 117: 198-209.

10. Chaterjee A, Shukla S, Mishra P, Rastogi A and Singh S. Prospects of in vitro production of thebaine in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Industrial Crops and Products* 2010; 32: 668-70.

11. Yesil-Celiktas O, Gurel A and Vardar-Sukan F, Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. 2010, Kerala: Transworld Research Network.

12. Jeong C S, Murthy H N, Hahn E J, Lee H L and Paek K Y. Inoculum size and auxin concentration influence the growth of adventitious roots and accumulation of ginsenosides in suspension cultures of *Panax ginseng* (C. A. Meyer). *Acta Physiologiae Plantarum.* 2009; 31; 09; 219-22.

13. Paek K, Murthy H, Hahn E and Zhong J. Large scale culture of ginseng adventitious roots for production of ginsenosides. *Advanced Biochemical Engineering Biotechnol.* 2009; 113: 151-76.

14. Ballica R and Ryu D. Effects of rheological properties and mass transfer on plant cell bioreactor performance: production of tropane alkaloids. *Biotechnology Bioengineering* 1993; 42: 1181-89.

15. Wu S, Yu X, Lian M, Park S and Piao X. Several factors affecting hypericin production of *Hypericum perforatum* during adventitious root culture in airlift bioreactors. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2014; 36: 975-81.

16. Lee J, Seong E, Goh E, NY K and Yu C. Factors involved in mass propagation of Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) using bioreactor system. *J. Korean Society Applied Biological Chemistry* 2009; 52: 466 – 71.

17. McClung C R. Circadian rhythms in plants. *Plant Physiol.* 2001; 52: 139 – 62.

18. Luschig C. Auxin transport: ABC proteins join the club. *Trends Plant Science* 2002; 7 (8): 329 – 32.

