

배양 조건에 따른 식물세포 크기 지수의 변화

김 상 목 · 박 인 석 · 이 상 윤 · 이 규 화 · †김 동 일

인하대학교 공과대학 생물공학과

(접수 : 1998. 5. 9., 게재승인 : 1998. 6. 1.)

Changes of Plant Cell Size Index by Culture Conditions

Sang-Mock Kim, In-Suk Park, Sang-Youn Lee, Gyu-Wha Lee, and Dong-II Kim†

Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 1998. 5. 9., Accepted : 1998. 6. 1.)

Effects of various environmental factors on cell size index(FCW/DCW) in *Thalictrum rugosum*, *Lithospermum erythrorhizon* and *Taxus cuspidata* plant cell suspension cultures were investigated. Time course changes of cell size index were also observed. In batch cultures, FCW/DCW increased according to the decrease of sugar concentration. For short-term experiment within 24 hr, FCW/DCW value could be reduced significantly by increasing sugar concentration. When an osmoticum such as mannitol was added, FCW/DCW converged to a low value. Therefore, it was confirmed that osmolality of the medium was important in determining cell size or water content of the cells. Inorganic salts or treatment with organic solvent also exhibited some effect on the cell size index. However, pH and centrifugal force did not show any influences. On the other hand, it was found that the addition of Pluronic F-68 reduced FCW/DCW. By combining these results effectively, it may be possible to increase the cell concentration in high density culture to a higher extent.

Key Words : Cell Size Index, Osmolality, Plant Cell Culture

서 론

식물은 고유의 유전적 다양성으로 인해 과거 세계의 많은 나라들에서 여러 가지 의약품으로 사용되어 왔으며, 앞으로도 새로운 구조와 그에 따른 유용한 생리활성을 지닌 화학물질을 생산하는데 있어 무한한 잠재력을 가진 원료로서 인정받고 있다. 이러한 물질들을 대량으로 얻기 위해서는 완전한 식물체에서 추출하는 것보다 식물세포배양을 이용하는 것이 무엇보다도 안정적인 공급 측면에서 유리하다(1). 근래에 관심의 대상이 되어온 항암제 paclitaxel의 주목으로부터의 공급 부족과 이를 해결하기 위한 세포배양의 이용은 대표적인 예라고 할 수 있다(2). 이와 같은 식물 유래의 이차대사산물을 생산하는 도구로서 뿐만 아니라 최근에는 형질전환 기술에 의한 외래 단백질 의약품을 생산하는데 있어서도 세포배양의 장점을 이용하고자 한다(3). 그러나 식물세포 대량배양의 필요성이 높아지는 추세에도 불구하고 아직까지는 배양공정에 대한 연구가 부족한 실정이다. 식물세포는 미생물에 비해 증식속도가 느리며 초기 집중농도도 높아야하기 때문에 대량배양으로 갈수록 많은 중간 단계가 필요하게 된다

(4). 배양과 배양 사이의 준비기간까지 고려한다면 식물세포배양에 의한 유용물질 생산의 생산성은 낮아질 수밖에 없다. 이러한 약점을 보완하고 경제성과 생산성을 높이기 위한 방법으로 고려할 수 있는 것이 고농도 배양이다(5). 가능한한 높은 농도까지 세포를 배양하기 위해서는 세포의 크기가 문제가 될 것이다. Tanaka(6)에 의하면 식물세포의 수분 함량을 94-96%라고 가정하여 배양기내에 세포가 완전히 가득 찰 경우 40-60 g/L의 세포건조중량을 얻을 수 있다고 하나, 실제의 경우 세포와 세포 사이의 빈 공간에 물이 존재하므로 이보다 더 적은 양인 30 g/L 정도가 식물세포배양을 통하여 얻을 수 있는 최고 농도라고 한다. 그러나 식물세포 내의 수분 함량을 감소시킴으로써 보다 고농도의 세포를 얻을 수 있을 것이다(7).

식물세포는 세포벽과 액포를 지니고 있으며 다른 종류의 세포보다 많은 물을 함유할 수 있는 능력이 있으므로 세포 외부의 삼투압의 변화에 따라 내부에 생성되는 turgor pressure로 인해 세포의 크기가 달라지게 된다(8). 즉 배지의 삼투압이 높으면 세포의 수분 함량이 낮아지면서 세포가 작아지고, 삼투압이 낮으면 수분 함량이 높아지면서 상대적으로 세포의 크기가 커지게 된다. 이를 직접적으로 나타내 주는 지표가 세포생체중량 대 세포건조중량의 비(FCW/DCW ratio)이다. 따라서 이를 세포 크기 지수(cell size index)라고 할 수 있다. 일반적인 회분식 배양 시에는 초기 당농도가 높은 상태에서 cell size index는 낮은 값을 나타내며, 후반부에 당이 고갈되면 급격히 증가하게 된다(7, 9). 배지내 삼투압에 가장 큰 영향을 미치는 성분은 당이며 무

† Corresponding author : Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel : 032-860-7515, Fax : 032-875-0827

e-mail : kimdi@dragon.inha.ac.kr

기염류의 농도도 삼투압과 관련이 있다. 세포의 농도가 높아질 경우 공간상의 제약을 받게 되므로, 부작용이 없는 한도 내에서 삼투압을 높이면 이론적으로 볼 때 절대 세포량은 늘게 된다. 삼투압의 증가를 위해 당을 사용할 경우는 catabolite repression에 의한 세포 증식에 방해가 있을 수 있으므로 mannitol이나 sorbitol과 같은 당이 아닌 삼투압 증진제를 첨가하거나 무기염류의 농도를 높이는 것을 고려할 수 있다.

본 연구에서는 배양 시간의 변화와 당농도에 따른 cell size index의 변화를 파악하고, cell size index에 영향을 미치는 여러 가지 인자들을 조사하여 고농도 배양에 적용이 가능한 조건을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양, 배지 및 시약

세포주로는 *Thalictrum rugosum*, *Lithospermum erythrorhizon* 및 *Taxus cuspidata* 현탁세포를 사용하였다. *T. rugosum* 세포는 미국 Rutgers 대학의 Dr. Pedersen으로부터 제공받았다. 생장배지로는 Murashige & Skoog(MS) 배지에 2 μM의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D), 30 g/L의 sucrose를 첨가하였다. *L. erythrorhizon* KCTC PCL 52001 세포는 생명공학연구소 유전자은행(KCTC)으로부터 분양을 받았으며 Schenk & Hildebrandt(SH) 기본배지에 10 μM의 p-chlorophenoxyacetic acid(pCPA), 1 μM의 kinetin, 및 30 g/L의 sucrose를 첨가하여 세포를 유지하였다. *T. cuspidata* 세포는 국내에 자생하는 주목으로부터 유도하였으며 역시 SH 배지를 사용하였다. 탄소원은 20 g/L의 sucrose를 사용하였으며, 5 mg/L의 α-naphthalenacetic acid(NAA)와 0.2 mg/L의 6-benzylaminopurine(BAP)를 첨가하였다. MS 배지는 pH를 6.0으로 SH 배지는 pH를 5.8로 조절하여 가압 증기멸균한 것을 사용하였으며 모든 세포는 30 mL의 배지를 함유한 125-mL flask에 10%(v/v)로 접종하여 암소의 회전식 진탕배양기에서 120 rpm, 25°C 조건하에서 유지하였고, 10일 간격으로 계대배양하였다. 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma 사(St. Louis, 미국) 제품을 사용하였다.

세포량 및 삼투압 측정

세포량과 cell size index를 결정하기 위해서는 세포생체중량(fresh cell weight, FCW)과 세포건조중량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 먼저 배양액을 Buchner 깔때기를 이용하여 Whatman No. 1 여과지로 걸러 내고 동량의 물로 2회 세척한 후 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고, 세포를 계량접시에 옮겨 FCW를 측정한다 다음 60°C로 고정된 dry oven에서 항량이 되도록 건조시켜 DCW를 측정하였다.

삼투압은 Osmette A Model 5002 Osmometer(Precision Systems, Natick, 미국)를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

회분식 배양에서의 FCW/DCW(cell size index)의 변화

식물세포의 생장특성은 DCW에 근거하여 파악하는 것이 일반적이다. 이것은 fresh cell 내에 함유된 수분 함량의 차이에 의하여 FCW의 측정치가 부정확할 수 있기 때문이며 수분의 함유

정도는 FCW/DCW를 이용하면 계산이 가능하다. 세포의 크기 혹은 부피는 수분의 함량에 비례하므로 FCW/DCW 값을 세포 크기 지수(cell size index)라고 할 수 있다. 회분식 배양의 경우 cell size index는 당농도가 높고 세포생장이 빠른 대수증식기에 낮은 값을 유지하다가 당이 고갈되는 정지기에서 급격히 증가하는 것이 보통이다. 이는 탄소원으로 사용되는 당농도에 따라 배지의 삼투압이 변화하고 이로 인해 세포의 수분함량도 영향을 받기 때문인 것으로 여겨진다. Figure 1(a)는 *Thalictrum rugosum* 현탁배양에서 시간의 경과에 따른 세포 성장과 FCW/DCW의 변화를 나타낸 것이다. 배양 시작시 접종된 세포는 계대후 7일이 지난 것을 사용하였기 때문에 초기에는 FCW/DCW가 비교적 높은 수치를 보이며, 접종후 2일이 지나면 FCW/DCW는 6 이하로 떨어져 9일째까지는 그 값이 지속적으로 감소하다가 이후부터 14일째까지 계속 증가하여 11.7로 2배 가까이 상승하는 경향을 볼 수 있다. Rho 등(10)에 의한 *Sanguinaria canadensis* 세포배양이나 Drapeau 등(11)에 의한 *Dioscorea deltoidea* 배양에서도 이와 유사한 결과가 보고된 바 있다. 따라서 세포 내 수분의 함량이 배양 시간에 따라 변화하는 것을 알 수 있으며, 적절한 삼투압 증진제의 처리는 세포의 크기를 작게 유지하여 고농도 배양을 가능하게 해 줄 수 있다고 판단된다.

*Lithospermum erythrorhizon*의 경우 Figure 1(b)에 나타낸 것과 같이 *T. rugosum*과 유사한 결과를 보였다. 그러나 초기

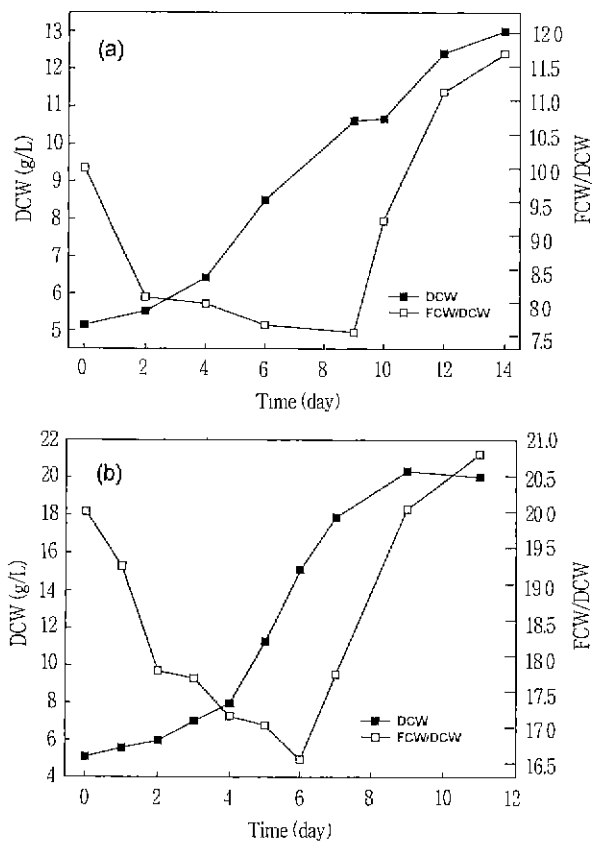


Figure 1. Time course change of cell growth and FCW/DCW ratio. (a) *T. rugosum* cell suspension in MS medium containing 3% sucrose, (b) *L. erythrorhizon* cell suspension in SH medium containing 3% sucrose.

FCW/DCW 값과 대수증식기에서의 값이 상대적으로 높았다. Drapeau 등(11)에 따르면 *D. deltoidea*와 *Catharanthus roseus*의 경우, 같은 농도의 당을 첨가하더라도 다른 FCW/DCW를 보인다고 한다. 이는 FCW/DCW 값이 세포의 종류에 따라 달라짐을 의미한다. 즉 배양 환경과 상관없이 종에 따라 세포벽의 조성 등의 차이로 인해 세포의 크기가 근본적으로 다르다고 할 수 있다.

당농도 증가에 따른 단기간의 cell size index의 변화

위의 Figure 1에서 보면 초기에 cell size index가 급격히 감소함을 알 수 있다. 이러한 현상을 정량적으로 관찰하기 위하여 배지 내의 당농도를 증가시켰을 때 변화하는 cell size index를 단기간 동안 관찰하여 보았다. Figure 2(a)에 나타낸 것과 같이 *T. rugosum*의 경우 당농도가 증가함에 따라 16시간 후에 cell size index는 낮아졌으며, 감소하는 속도도 빨랐다. 100 g/L의 sucrose 첨가시에 FCW/DCW 값은 가장 낮은 8.6이었으며, 20 g/L 첨가시에는 초기 값(10.6)과 16시간 경과후의 값의 차이가 거의 없었다. 또한 당농도가 증가함에 따라 초기에 급격한 감소를 보인다.

Figure 2(b)의 *L. erythrorhizon*의 경우도 *T. rugosum*과 유

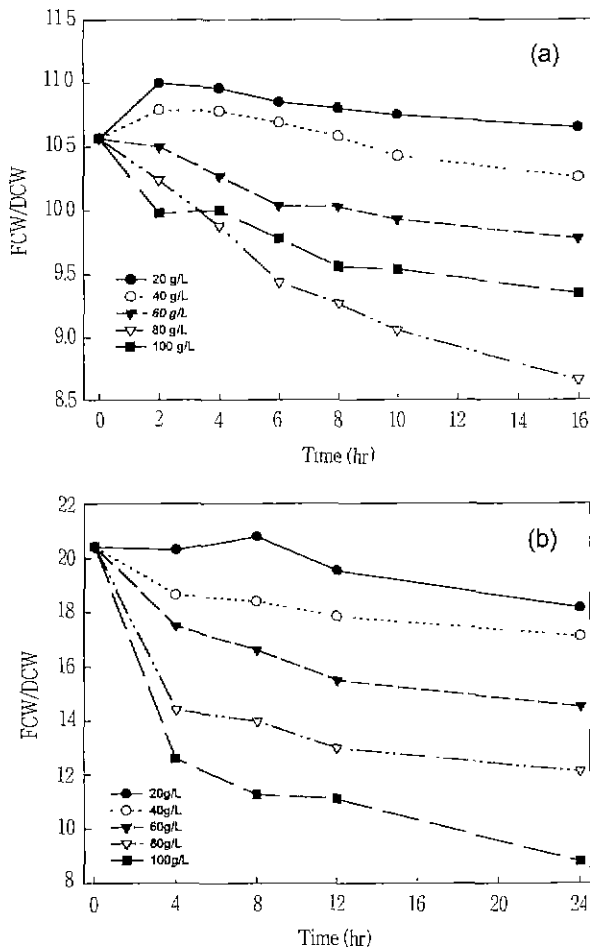


Figure 2. Changes of cell size index in a short period of time at various concentrations of sucrose in cell cultures of *T. rugosum* (a) and *L. erythrorhizon* (b).

사한 경향을 보였다. 그러나 종의 차이에 따른 기본적인 cell size index의 차이로 인해 초기치가 *T. rugosum*보다 큰 20.5였으며 24시간 경과 후의 경우 100 g/L sucrose 첨가시 9.0, 20 g/L 첨가시 18.0이었다. 이상과 같이 단기간 동안 cell size index의 변화를 관찰한 결과 세포는 일정시간 내에 당농도 변화로 인한 배지 내의 삼투압 변화에 적응하며, 이로 인한 세포의 수분 함량의 변화가 심함을 알 수 있었다.

Cell size index의 변화에 영향을 미치는 최대 당농도

세포의 cell size index를 최대로 감소시킬 수 있는 임계 당농도, 즉 세포의 수분 함량을 최대한 줄일 수 있는 당농도를 확인하고자 배양 4일째와 24일째에 당농도에 따른 변화를 확인하였다. Figure 3에서 볼 수 있는 것과 같이 *T. rugosum*의 경우 당농도와 시간의 경과에 따른 영향이 모두 나타났으며, 10% 이상의 당농도에서는 배양 시기와 상관없이 그 영향이 크지 않았다.

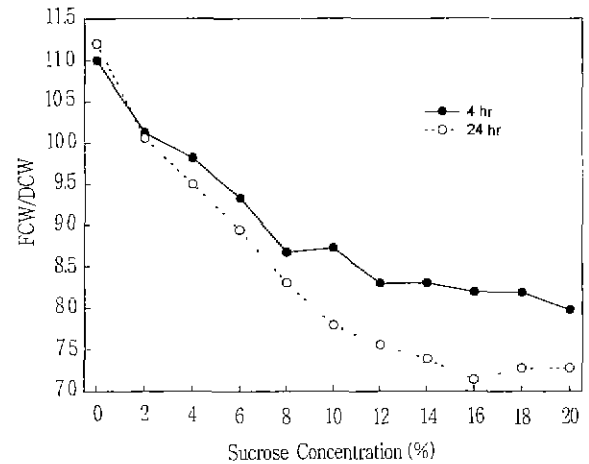


Figure 3. Cell size index with respect to sucrose concentration for 4 hr and 24 hr in *T. rugosum* cell cultures.

삼투압 증진제(osmoticum)의 첨가가 cell size index에 미치는 영향

고농도의 당의 첨가에 의한 세포 크기의 변화는 외부의 당농도 증가로 인한 세포 내부의 전분 함유량이 변화되는 substrate-controlled process와 외부 삼투압의 변화로 인한 세포의 팽창이 억제되는 삼투효과에 의한 것으로 설명된다(11).

Chandler와 Dodds(12)는 callus를 5~8%의 sucrose가 첨가된 배지에서 배양할 경우 cell size index가 감소하는 이유로 세포 내의 전분 축적에 의한 결과임을 제시하였다. 만약 이러한 현상이 삼투효과에 의한 것이라면 탄소원으로 사용되는 sucrose가 아닌 배지 내의 삼투압에만 영향을 주는 osmoticum에 의해서도 같은 현상을 보일 것이다. Mannitol이나 sorbitol과 같은 당알코올은 식물세포의 대사에 의한 소모가 되지 않으므로 배지의 삼투압만을 증가시키는데 사용할 수 있다(13). Figure 4(a)는 *T. rugosum* 배양에서 세포의 생존을 위해 sucrose를 2%의 농도로 첨가하고, mannitol의 농도를 다양하게 변화시켜 짧은 시간 동안 cell size index의 변화를 조사한 것이다. 예상과 같이 mannitol의 농도가 증가함에 따라 cell size index가 급격히 감소함을 볼 수 있다. 또한 그 경향도 앞에서 sucrose만으로 실험한 경우와 비슷하였다. *L. erythrorhizon*도 Figure 4(b)와 같이

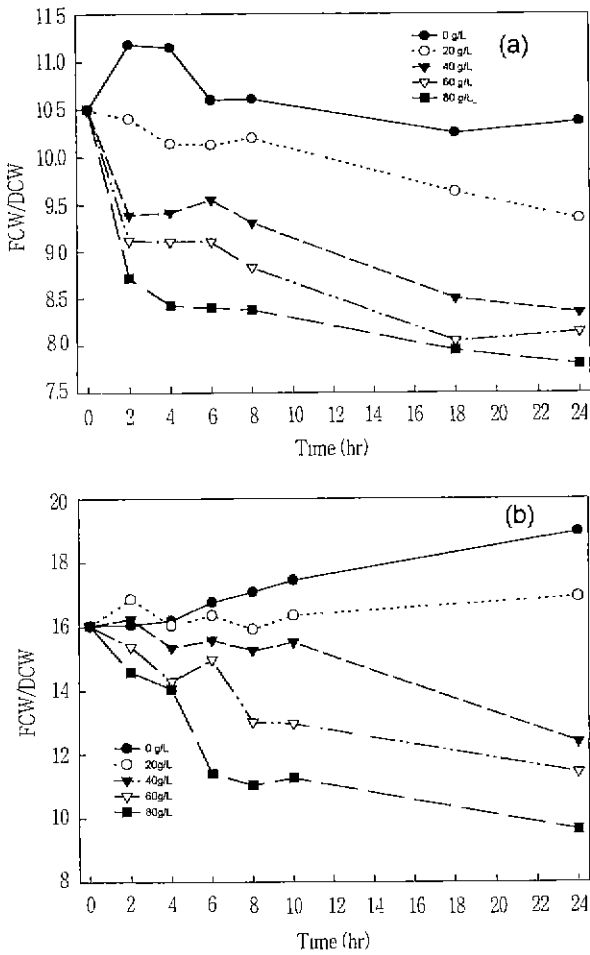


Figure 4. Short-term changes of cell size index at various concentrations of mannitol. (a) *T. rugosum*, (b) *L. erythrorhizon*.

유사한 추세를 보였다. 따라서 osmoticum을 첨가해 주면 cell size를 줄여, 좀 더 고농도까지 세포배양이 가능할 것으로 생각된다.

Cell size index에 영향을 미치는 여러 가지 인자들에 대한 연구

삼투압을 높이기 위해서는 당이나 당알코올 이외에도 무기염류를 사용할 수 있다. 물론 배지내 무기염류 농도의 변화는 생장에 부정적인 영향을 미칠 가능성이 높으므로 성장 억제를 확인하여야 할 것이다. *T. rugosum* 배양에서 MS 기본배지의 농도를 4배까지 증가시키면서 단기간 세포의 cell size를 조사한 결과 Figure 5(a)에서와 같이 기본배지의 농도가 증가함에 따라 삼투압의 증가로 인하여 10시간 이내에 급격히 cell size index가 감소하였다. *L. erythrorhizon*의 경우에도 유사한 결과를 확인할 수 있었다(Figure 5(b)).

배지의 pH는 세포의 성장뿐만 아니라 이차대사산물의 생성이나 permeability에도 영향을 미치는 인자이다. 그러므로 pH의 변화가 cell size에도 영향을 미치는가 알아보기 위하여 *T. rugosum*과 *L. erythrorhizon* 배양에서 pH를 2부터 10까지 변

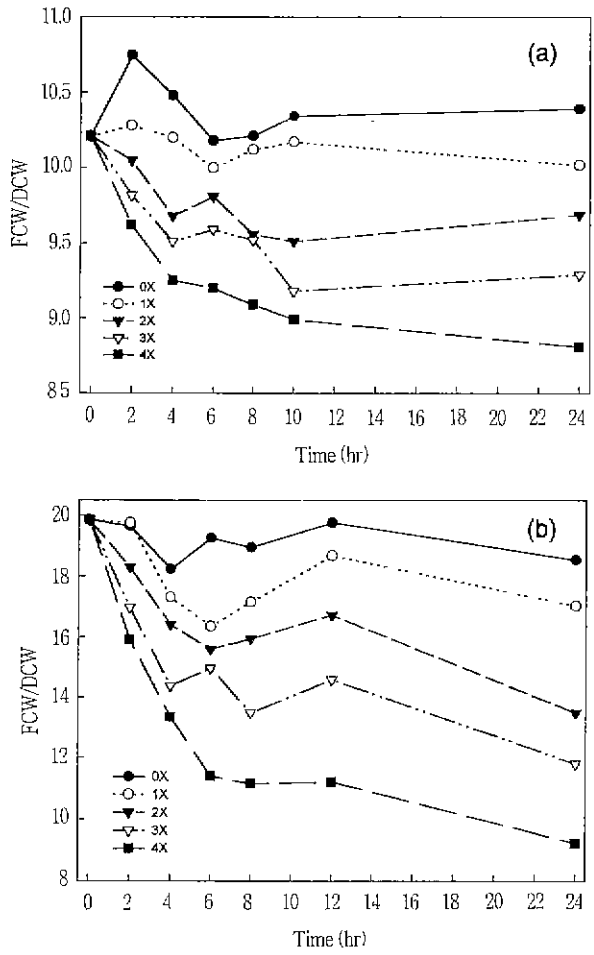


Figure 5. Short-term changes of cell size index at various concentrations of basal salts. (a) *T. rugosum* cell culture in MS medium, (b) *L. erythrorhizon* cell culture in SH medium.

화시키면서 24시간동안 cell size index를 관찰하였다. 그 결과 pH 2를 제외하고는 큰 변화가 없음을 알 수 있었다. pH 2에서만 cell size index가 다소 낮게 나타났는데 cell lysis에 기인한 것이 아닌가 확인하기 위하여 현미경으로 관찰한 결과 lysis 징후는 발견할 수 없었다.

한편 유기용매를 소량 첨가하는 경우 세포의 permeability를 증대시키는 것이 알려져 있으며 DMSO(dimethyl sulfoxide) 처리가 그 대표적인 예라고 할 수 있다(14). 따라서 *T. rugosum*과 *L. erythrorhizon* 배양에서 DMSO를 처리하여 cell size에 영향을 줄 수 있는지 조사하였으며 결과는 Figure 6에 정리한 바와 같다. 고농도의 DMSO를 처리하면 세포의 생존도가 저하되므로 10%(v/v)까지 여러 농도의 DMSO를 30분간 처리한 후 배지로 2회 세척하고 새로운 배지에서 24시간동안 배양하며 cell size index를 관찰한 결과 *T. rugosum*의 경우에는 10% 농도까지 큰 변화가 없음을 확인하였다. 그러나 *L. erythrorhizon*의 경우에는 DMSO의 농도가 증가함에 따라 cell size index가 낮아지는 결과를 나타내었다. 따라서 세포의 종류에 따라 다르게 영향을 받음을 알 수 있었다.

진술한 바와 같이 세포의 크기는 결국 세포 내에 존재하는 수

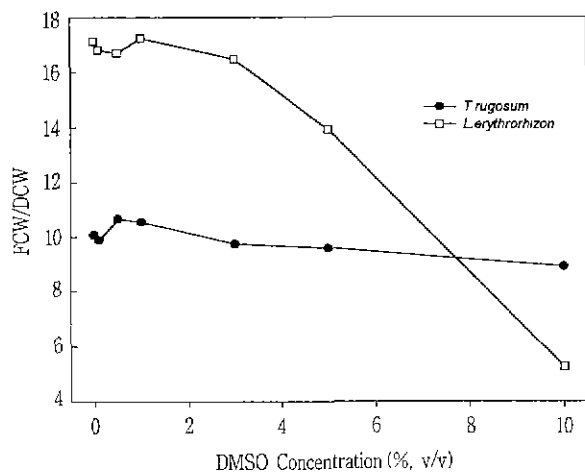


Figure 6. Effect of DMSO concentration on cell size index in *T. rugosum* and *L. erythrorhizon* cell cultures.

분 함량에 의해 변화한다. 따라서 원심력과 같은 외부로부터의 물리적인 힘에 의하여 세포의 크기가 변화하는지를 알아보고자 4000 rpm까지 원심분리한 후 cell size index를 살펴보았다. 그러나 4000 rpm까지의 원심력장에서는 cell size index가 거의 변하지 않음을 확인할 수 있었는데 이로부터 물리적인 힘에 의해서는 세포 내의 수분 함량이 변하지 않는다고 결론 내릴 수 있다.

Pluronic F-68이 cell size에 미치는 영향

동물세포나 식물세포와 같이 전단응력(shear stress)에 민감한 세포를 bioreactor 내에서 배양시 보호 효과를 보인다고 알려진 Pluronic F-68을 첨가한 결과 기대하던 효과 이외에 이 계면활성제가 식물세포의 크기에 영향을 미침을 확인하였다. Taxane을 생산하는 *Taxus cuspidata* 세포 배양에서 Pluronic F-68이 cell size index에 미치는 영향을 조사한 결과는 그림 7과 같다. Pluronic F-68이 첨가되면 cell size index가 20% 정도 감소하는 것으로 나타났는데 이와 같이 Pluronic F-68이 세포의 크기를 줄여주는 현상은 기존 문헌에 전혀 보고된 바 없으므로 식물세포 고농도 배양에 여러 가지 장점을 동시에 부여할 수 있을 것으로 기대된다. Pluronic F-68은 미생물, 동물, 곤충 세포배양에 널리 사용되어 온 non-ionic surfactant로 소수성인 polyoxypropylene과 친수성인 polyoxyethylene의 co-polymer이다. 소수성 부분이 세포막의 소수성 부분과 결합하여 세포 주위에 보호막을 형성하여 전단응력으로부터 세포를 보호하는 역할을 한다고 알려져 있다(15). 또한 세포와 기포간의 상호작용을 방해함으로써 기포가 터질 때 발생하는 충격을 완화시키는 작용도 보고된 바 있다(16). 그러나 식물세포 배양에서는 Pluronic F-68의 기작과 효과에 대하여 알려진 것이 거의 없다. Cell size index를 줄여준다는 것은 삼투압과 관련이 있을 가능성이 높으므로 20 g/L까지의 Pluronic F-68을 첨가한 상태에서 osmometer를 이용하여 삼투압을 측정하여 보았는데, 삼투압은 전혀 증가하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 삼투압에 영향을 미치지 않으면서도 cell size index에 변화를 주는 원인을 찾아야 할 것이다.

결론적으로 이상에서 얻은 cell size index를 변화시킬 수 있

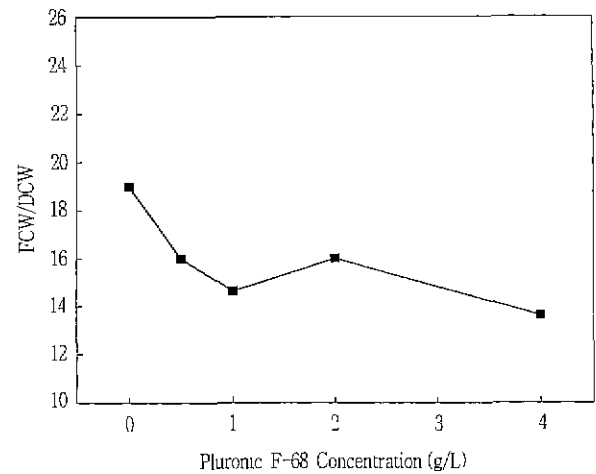


Figure 7. Effect of Pluronic F-68 on cell size index in *Taxus cuspidata* cell culture.

는 정보들을 적절하게 이용하는 공정을 도입한다면 좀 더 높은 농도까지 식물세포배양이 가능할 것이며, 그로 인해 유용물질 생산시 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 *Thalictrum rugosum*, *Lithospermum erythrorhizon* 및 *Taxus cuspidata* 등 세 가지 식물세포 현탁배양에서 시간의 변화와 당농도에 따른 cell size index (FCW/DCW)의 변화를 조사하였다. 또한 cell size에 영향을 미치는 여러 가지 인자들을 조사하여 고농도 배양에 적용이 가능한 조건을 찾고자 시도하였다. 회분 배양의 경우 당이 소모됨에 따라 FCW/DCW는 증가하였으며, 24 시간 이내의 단기간 동안에도 당농도가 증가함에 따라 FCW/DCW 값은 감소함을 알 수 있었다. 삼투압 증진제인 mannitol을 첨가할 경우에도 당농도의 증가와 유사한 결과를 보이는 것으로 보아 FCW/DCW의 감소는 삼투압 증가에 의한 것임을 확인하였다. 세포의 종류에 따라 차이가 있기는 하지만 무기염류의 농도, 유기용매의 처리도 cell size index에 영향을 미침을 알 수 있었다. 그러나 pH의 변화나 원심력의 부가는 큰 영향이 없었다. 한편 계면활성제의 일종인 Pluronic F-68의 첨가시 삼투압의 증가와 무관하게 cell size index를 변화시킴을 확인하였다 이상의 결과를 적절하게 이용한다면 좀 더 높은 농도까지 식물세포배양이 가능할 것으로 예상된다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 지원 '95 특정기초연구(과제번호 95-0502-03)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Payne, G. F., V. Bringi, C. L. Prince, and M. L. Shuler (1991), Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems, pp. 3-10, Hanser Publishers, Munich.

2. Fett-Neto, A. G. and F. DiCosmo (1996), Production of Paclitaxel and Related Taxoids in Cell Cultures of *Taxus cuspidata*, Plant Cell Culture Secondary Metabolism Toward Industrial Application (F. DiCosmo and M. Misawa, eds.), pp. 139-166, CRC Press, Boca Raton.
3. Hogue, R. S., J. M. Lee, and G. An (1990), Production of a Foreign Protein Product with Genetically Modified Plant Cells, *Biotechnol. Prog.*, **12**, 533-538.
4. Fujita, Y. (1990). The Production of Industrial Compounds, Plant Tissue Culture: Application and Limitation (S. S. Bhojwani, ed.), pp. 259-275, Elsevier, New York.
5. Su, W. W. and F. Lei, and A. E. Humphrey (1993), Production of Rosmarinic Acid in High Density Perfusion Cultures of *Anchusa officinalis* Using a High Sugar Medium, *Biotechnol. Lett.*, **12**, 791-798.
6. Tanaka, H., Large-scale Cultivation of Plant Cells at High Density (1987), *Process Biochem.*, **22**, 106-113.
7. Park, I.-S. and D.-I. Kim (1993), Significance of Fresh Weight to Dry Cell Weight Ratio in Plant Cell Suspension Cultures, *Biotechnol. Tech.*, **7**, 627-630.
8. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson (1994), *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., pp. 1000-1002, Garland Publishing, Inc., New York.
9. Battat, E., J. S. Rokem, and I. Goldberg (1989), Growth of *Dioscorea deltoidea* at High Sugar Concentrations, *Plant Cell Rep.*, **7**, 652-654.
10. Rho, D., N. Chauret, N. Laberge, and J. Archambault (1992), Growth Characteristics of *Sanguinaria canadensis* L. Cell Suspension Cultures and Immobilized Cultures for Production of Benzophenanthridine Alkaloids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 611-617.
11. Drapeau, D., H. W. Blanch, and C. R. Wilke (1986), Growth Kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in Batch Culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1555-1563.
12. Chandler, S. F. and J. H. Dodds (1983), The Effect of Phosphate, Nitrogen, and Sucrose on the Production of Phenolics and Solasodine in Callus Cultures of *Solanum laciniatum*, *Plant Cell Rep.*, **2**, 205-208.
13. Brown, D. C. W., D. W. M. Leung, and T. A. Thorpe (1979), Osmotic Requirement for Shoot Formation in Tobacco Callus, *Physiol. Plant.*, **46**, 36-41.
14. Brodelius, P. E. (1988), Permeabilization of Plant Cells for Release of Intracellularly Stored Products: Viability Studies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 561-566.
15. King, A. T., K. C. Lowe, and B. J. Mulligan (1988), Microbial Cell Responses to a Non-ionic Surfactant, *Biotechnol. Lett.*, **10**, 177-180.
16. Chattopadhyay, D., J. F. Rathman, and J. J. Chalmers (1995), The Protective Effect of Specific Medium Additives with Respect to Bubble Rupture, *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 473-480.