

## 빛 조사시간에 따른 형질전환된 담배세포 성장과 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향

<sup>1</sup>이재화·<sup>1</sup>김난선·<sup>1</sup>김영숙·홍신영·신윤지·서조은·<sup>2</sup>권태호·†양문식  
전북대학교 자연과학대학 생물과학부, <sup>1</sup>전북대학교 기초과학연구소, <sup>2</sup>전북대학교 유전공학연구소  
(접수 : 2001. 11. 6., 게재승인 : 2001. 12. 14.)

## The Effects of Light on the Production of hGM-CSF in Transgenic Plant Cell Culture

Jae-Hwa Lee<sup>1</sup>, Nan-Sun Kim<sup>1</sup>, Young-Sook Kim<sup>1</sup>, Shin-Young Hong, Yun-Ji Shin, Jo-Eun Seo, Tae-Ho Kwon<sup>2</sup>,  
and Moon-Sik Yang<sup>†</sup>

Division of Biological Sciences, Chonbuk National University

<sup>1</sup>Basic Science Research Institute, Chonbuk National University

<sup>2</sup>Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University

(Received : 2001. 11. 6., Accepted : 2001. 12. 14.)

Light is one of the most important environmental factors controlling plant physiology. The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) was produced from cell suspension cultures of transgenic tobacco under different light conditions (24 hr light, 18 hr light/dark cycle, dark). Under 24 hr light condition, cell growth was best and dry cell weight reached 14.4 g/L. Light did not influence the secretion of total proteins. However, in the dark condition, the ratio of secreted total protein/dry cell weight was 1.5 fold higher than those of other conditions. Production of hGM-CSF was highest with 18 hr light condition and reached 496.5  $\mu$ g/L. In addition, the content of hGM-CSF in secreted total proteins was 1.8 fold higher than that of 24 hr light condition, which is beneficial for the purification of the protein.

**Key Words** : transgenic plant, plant cell culture, hGM-CSF, light culture, dark culture

### 서 론

재조합 단백질을 생산하기 위해서 현재 가능한 방법은 미생물, 동물, 식물세포를 이용하는 방법과 형질전환 동물과 식물을 이용하는 방법이 있다(1). 이 중에서 상업적으로 가장 유용한 방법의 결정은 단백질의 종류와 용도에 따라 달라진다. 즉 생산비용과 시장규모, 생산된 단백질의 효능, 안전성과 안정성 등을 고려하여야 하며, 아울러 기존의 방법에 의하여 생산하는 것과 생물화학적, 약리학적인 비교를 하여야 한다. 지난 15-20년 간은 주로 미생물과 동물세포배양방법에 집중적인 관심을 기울였지만 최근에는 식물체 또는 식물세포배양시스템 또한 재조합 단백질을 대량생산하는 시스템에 대

한 집중적인 연구가 수행되고 있다(2,3). 식물세포를 이용한 재조합 단백질의 생산은 단백질의 안정성에 많은 영향을 미치는 전사 후 수식과정 (post-translational modification)이 가능하는 장점이 있다. 식물세포배양배지는 간단한 이온과 합성시약으로 배양이 가능하고 생산된 재조합 단백질의 분비가 가능하여 분리정제가 쉬운 장점이 있다(3). 식물세포배양의 재료로 가장 많이 사용되는 담배를 이용한 유용 외래 단백질의 생산은  $\beta$ -glucuronidase(4), 항체(5), interleukin(6), ricin(7), mGM-CSF(8), hGM-CSF(9,10), G-CSF(11) 등이 보고되고 있으나, 식물세포배양을 이용한 경우에는 공통적으로 생산수율이 낮은 점이 문제점으로 지적되고 있으며 생산수율을 향상시키기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다(9,10). 또한 최근에 담배에 비해서 세포의 성장은 2-3배가 늦지만 재조합 단백질의 생산수율이 월등히 높은 새로운 시스템이 개발되어  $\alpha_1$ -antitrypsin을 대량생산할 수 있는 길이 열렸지만 아직 많은 연구가 필요하다(12-14).

GM-CSF는 조혈모세포에 작용하여 백혈구의 생성을 촉진하는 당단백질로서(15) 사람, 쥐, 긴팔원숭이, 소 등 몇 종의

†Corresponding Author : Division of Biological Sciences, College of Basic Sciences, Chonbuk National University, Dukjindong 664-14, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea  
Tel : +82-63-270-3339, Fax: +82-63-270-4334  
E-mail : mskyang@moak.chonbuk.ac.kr

포유동물에서 단백질의 아미노산 서열이 밝혀져 있으며, 사람의 경우 25개의 leader peptide를 포함하여 127개의 아미노산으로 구성되어 있다(16-18). GM-CSF는 항암 화학요법에 따른 호중구 (neutrophil) 감소증, 재생불량성 빈혈, 골수이형성 증후군, 자가골수이식, 후천성면역결핍증에 대한 임상 보고가 있으며, 특히 호중구 감소증과 골수 이식의 환자에 명확한 효과가 있음이 보고되어 있다(19-21).

담배세포를 이용한 재조합 단백질의 생산시 배양조건에 따라 성장과 재조합 단백질의 생산량에 큰 차이를 나타낸다. 기존의 보고에 의하면 단백질 안정화 효과가 있는 고분자를 첨가하거나(5,22), 세포의 접종 농도와 당의 농도를 증가시켜 재조합 단백질의 생산성을 향상시킬 수 있으며(23), 배지의 삼투압을 높여 분비를 촉진하여 생산성을 향상시킨 연구가 보고되었다(9). 본 연구에서는 hGM-CSF 유전자가 형질전환된 담배세포를 이용하여 현탁배양을 실시하였다. 이 담배세포는 명조건에서 계속 유지되어온 것이다. 하지만 대량으로 생물 반응기에서 원활히 배양하기 위해서는 암조건이 유리하다. 따라서 본 연구에서는 빛의 조사시간에 따른 담배세포의 성장과 분비된 hGM-CSF 생산에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 형질전환체로부터 현탁세포의 유도 및 배양

hGM-CSF 유전자가 도입된 형질전환 담배의 잎(24)을 절단하고 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0.02 mg/L, 8 g/L agar를 포함하는 MS 고체배지(25)에 치상하여 callus를 유도하였다. 현탁세포를 유도하기 위해 고체배지에서 형성된 callus를 50 mL의 동일조성의 MS 액체배지에 치상하여 25°C, 100 rpm의 조건으로 현탁배양 하였다. 각각의 배지에는 kanamycin 100 mg/L, sucrose 3%를 첨가하였으며 pH는 5.8로 조정하여 사용하였다. 현탁세포는 7일 간격으로 1/5의 비율로 계대배양 하면서 유지하였으며, 이를 재료로 하여 빛의 조사시간에 따른 세포의 성장 및 hGM-CSF의 분비량을 연구하기 위한 재료로 사용하였다.

### 빛의 조사량에 따른 세포성장 및 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향

빛의 조사량은 300 lux의 빛을 하루에 24시간, 18시간 조사한 것과 계속 암배양한 세가지 조건에서 성장과 hGM-CSF의 분비량을 측정하였다. 배양용기는 300 mL 플라스크를 사용하고 50 mL의 MS배지에 초기 세포는 생체중량으로 2.5 g을 접종하였다. 각 처리별로 세포의 생장은 세포의 생체중량 (fresh cell weight, FCW) 및 세포 건조중량(dry cell weight, DCW)을 측정하여 확인하였으며 세포 생체중량은 Büchner funnel을 이용하여 배양액을 Whatman No. 1 여과지로 거른 후 증류수로 수회 세척한 뒤 다시 여과하여 얻은 세포의 중량으로 하였고, 생체중량을 확인한 세포를 60°C의 건조기에 넣어 시간에 따른 무게변화가 없을 때까지 건조시켜 측정된 중량을 건조중량으로 하였다. 세포크기지수 (cell size index)는 건조중량을 생체중량으로 나누어 계산하였다.

### hGM-CSF 및 총 단백질의 정량

배양액 5 mL을 4°C, 14,000 rpm의 조건으로 5분간 원심분리하여 상등액을 분리한 후에 투석과정을 통하여 염분을 제거하였다. 생산된 hGM-CSF의 정량은 투석을 통하여 정제된 배양액을 Pharmingen Inc.(San Diego, CA, U.S.A)의 ELISA 분석 kit를 사용하여 정량 하였으며 분석 방법은 ELISA kit 제작회사의 표준방법을 사용하였다. hGM-CSF의 정량에 표준물질로 사용한 hGM-CSF는 대장균에서 생산된 hGM-CSF (Pharmingen Inc., San Diego, CA, U.S.A)를 사용하였다.

분비된 총단백질의 정량을 위해 먼저 배양액을 원심분리하여 세포를 제거한 후 상등액에 존재하는 총 단백질을 Bradford assay (Bio-rad, USA)법으로 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### 빛의 조사량이 담배식물세포의 성장에 미치는 영향

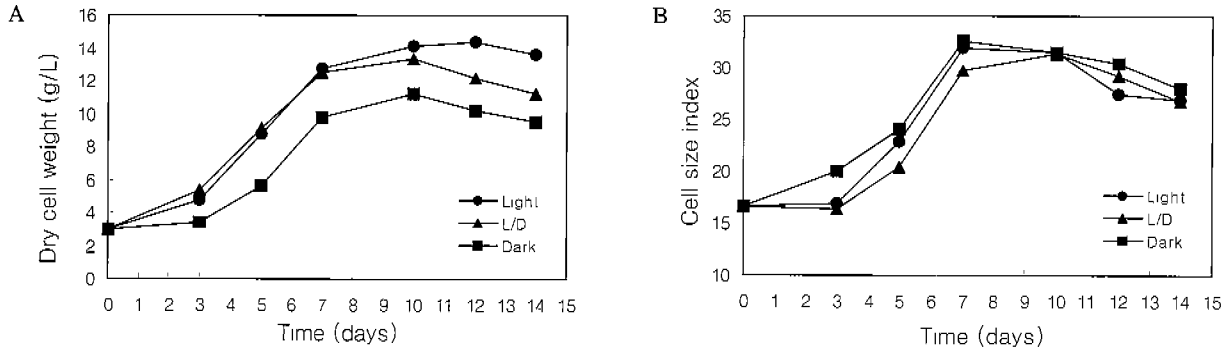
본 연구에서 사용한 형질전환된 담배세포는 사람의 GM-CSF 유전자가 안정적으로 도입된 형질전환된 식물의 잎으로부터 callus를 유도하고, 이 callus를 50 mL의 MS 액체배지에 현탁하여 덩어리를 제거하고 현탁세포만을 획득하였다. 이런 과정을 반복함으로써 균일한 현탁세포를 얻을 수 있었다. 이때 배양조건은 300 lux의 빛을 계속 조사하면서 현탁세포를 얻었다. 빛은 식물의 성장과 발달에 아주 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(26). 하지만 현탁세포에 미치는 영향에 대해서는 연구가 이루어져있지가 않다. 본 연구에서 얻어진 현탁세포는 옅은 녹색을 띄는 것으로 보아 엽록체가 발달함을 알 수가 있었다. 이렇게 만들어진 현탁세포의 일부를 암배양상태와 하루에 18시간 빛을 조사하는 배양환경에서 계대배양을 4차례 반복한 후의 세포를 이용하여 각각의 경우에서 세포의 성장을 조사하였다. 암조건에서 계대배양한 현탁세포는 세포의 색이 흰색으로 변하여 엽록체가 퇴화되는 것을 확인할 수가 있었으며 18시간 명배양의 경우에는 그 색깔로 판단했을 때, 엽록체의 발달정도가 지속적인 명배양의 경우보다 약해짐을 알 수가 있었다. 각각의 조건에서 세포의 성장정도를 정량적으로 관찰하기 위해, 현탁세포를 생체중량 (fresh cell weight)이 약 50 g/L가 되도록 하여 50 mL의 MS 액체배지에서 14일 동안 배양하면서 형질전환된 식물세포의 성장을 확인하였으며 그 결과는 Figure 1과 같다. 세가지 조건에서 현탁세포 접종 후 배양 3일까지는 lag phase를 포함하여 약간의 성장만이 이루어지다가 그 이후 급격하게 성장을 하였다. 18시간과 24시간 명조건의 경우 성장의 차이가 많지않지만 암조건에서 배양한 현탁세포는 성장속도가 30% 가량 둔화되었다. 접종후 10일이 지나면 모두가 성장이 정지기 (stationary phase)에 도달하였다. 최대 세포생산량은 Table 1에 정리한 바와 같으며, 24시간 명배양이 가장 크며, 18시간 명배양의 경우 7% 감소하고 암배양의 경우에는 22%가 감소한다. 이런 결과로 미루어보면 빛을 조사하는 경우 현탁세포에서도 광합성이 일어나고 이로 인해 세포성장수율이 높아지는 것으로 생각된다. 이와같은 결과는 식물세포를 암배양한 후 다시 명배양으로 전환했을 때 엽록소 (chlorophyll)의 합성이 촉진되는 결과와도 일치한다(27).

Figure 1에 나타난바와 같이 세포크기지수는 배양초기인 3

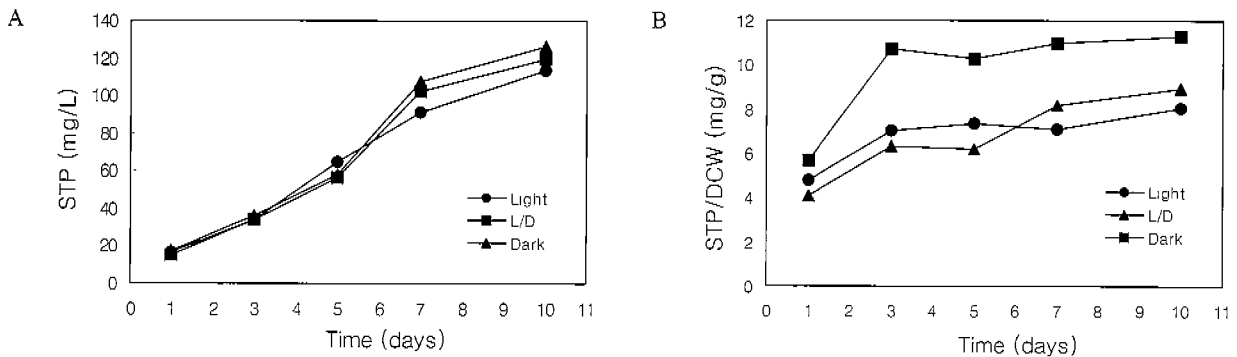
**Table 1.** Effect of light condition on cell growth and hGM-CSF production in suspension culture

Culture condition (light duration time/day)	Maximum dry cell weight (g/L)	Maximum hGM-CSF production ( $\mu$ g/L)	Maximum content of hGM-CSF in STP <sup>2</sup> (%)
24 hour	14.4	270.9	0.80
18 hour	13.4	495.5	1.45
0 hour <sup>1</sup>	11.2	331.5	0.90

<sup>1</sup>: dark culture, <sup>2</sup>: secreted total protein



**Figure 1.** Effect of light condition on the cell growth (A) and cell size index (B) during batch culture. The suspension cells were cultured under various light conditions (●: 24-hr light/day, ▲: 18-hr light/day, ■: dark condition). Cell size index was calculated by dividing fresh cell weight by dry cell weight.



**Figure 2.** Effect of light condition on the secretion of total proteins (A) during batch culture. (B) the content of secreted total proteins (STP) per dry cell weight (DCW). The suspension cells were cultured under various light conditions (●: 24-hr light/day, ▲: 18-hr light/day, ■: dark condition).

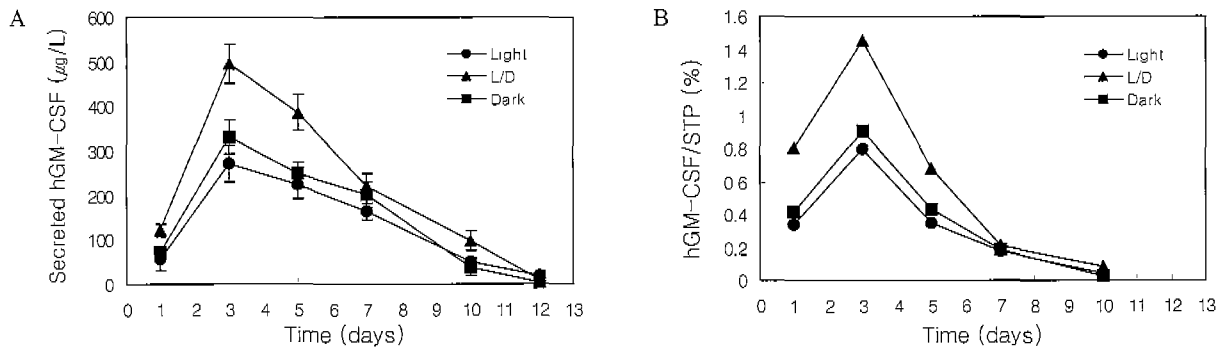
일 제에는 암배양한 세포의 크기가 다른 것에 비해 18 - 16% 크게 나타나지만 배양말기에는 거의 비슷하게 되는 경향을 나타내었다. 이것은 세포의 성장속도에 기인한 것으로 생각된다. 즉 세포의 분열이 왕성한 것일수록 세포의 크기는 작아지는 것을 알 수가 있다. 일반적으로 세포의 크기는 배양배지의 삼투압에 가장 많은 영향을 받지만(9,28), 본 연구에서와 같이 세포의 성장속도에도 기인할 수도 있으며, 빛의 유무에 따른 다른 생리적인 역할의 의한 영향의 가능성도 배제할 수는 없다.

**빛의 조사량이 재조합 단백질, hGM-CSF의 생산에 미치는 영향**

전술한 바와 같이 식물에서 빛은 성장과 발달 뿐 아니라 다양한 생리적인 역할을 수행한다. 즉 빛에 의해 세포의 1차 및 2차 대사가 많은 영향을 받음이 확인되고 있다(4,29). 하지만 빛의 조사에 의해 직접적으로 영향을 받는 프로모터를

사용한 재조합 단백질의 생산에 미치는 빛의 역할은 연구된 적이 있지만(30) 본 연구와 같이 간접적인 영향에 대한 연구는 전무한 상태이다. 먼저 배지로 분비된 총단백질의 양을 Bradford method로 정량하였다. Figure 2에 나타난 바와 같이 배양 5일째까지는 비슷하지만 이후에는 24시간 명배양의 경우 다른 것에 비해 10% 가량 낮은 경향을 나타내었다. 하지만 전체적으로 보아 빛에 의한 총단백질의 생산은 큰 영향을 받지 않음을 알 수가 있다. Figure 2 B에서 보는 바와 같이 단위세포당 분비되는 총단백질의 양은 세가지 경우 모두 배양 3일 째까지는 증가하다가 일정하게 되는 경향을 나타내었다. 이런 결과로 보면 배양 3일 째까지 세포내에서 단백질의 생산이 가장 왕성한 것을 알 수가 있다. 일반적으로 분비된 단백질의 양은 세포의 양에 비례할 것으로 생각되지만 암배양의 경우는 단위 세포당 생산하는 총단백질의 양이 다른 것에 비해 상대적으로 높은 결과를 나타내었다.

Figure 3에 나타낸 바와 같이 배지내로 분비된 hGM-CSF



**Figure 3.** Effect of light condition on the secretion of recombinant hGM-CSF during batch culture. (A) the each value were average concentrations of hGM-CSF measured by ELISA method, (B) the content of hGM-CSF in secreted total proteins (STP). The suspension cells were cultured under various light conditions (●, 24-hr light/day, ▲, 18-hr light/day, ■, dark condition).

가 세가지 배양조건 모두에서 3일째까지 양이 급격하게 증가하다가 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 18시간 명배양의 경우에 hGM-CSF의 생산량이 495.5 µg/L로 가장 높았으며 24시간 명배양에 비해 1.8배 증가하였다 (Table 1). 또한 분비된 총단백질에서 hGM-CSF의 비율 또한 1.8배 증가하여 실제 생산공정에서 hGM-CSF의 분리정제가 훨씬 용이해지는 장점도 있다. 또한 암배양의 경우도 명배양에 비해 세포의 성장속도는 늦지만 hGM-CSF의 생산량은 오히려 20% 가량 증가하였다. 결론적으로 빛은 식물세포의 성장뿐만 아니라 재조합 단백질의 생산 및 분비에도 많은 영향을 미침을 알 수가 있었다. 세포의 성장 및 hGM-CSF의 생산을 고려한 최적의 조건은 18시간 명조건으로 생각된다.

세가지 배양조건에서 모두 3일 이후에 생산된 hGM-CSF가 급격히 파괴되는 현상이 나타났다. 이런 현상은 담배세포를 이용한 재조합 항체 생산과 벼세포에서  $\alpha_1$ -antitrypsin의 생산 (5,13)에서도 관찰되는 현상이며 배지내의 단백질 분해효소때문일 것으로 생각된다.

### 요 약

빛은 식물에서 성장과 발달을 비롯한 다양한 생리화학적 역할을 지닌다. 본 연구는 hGM-CSF 유전자가 도입된 형질 전환 담배의 callus를 현탁배양하여 hGM-CSF를 생산할 때에 빛을 조사하는 시간에 따른 hGM-CSF의 생산에 미치는 영향을 확인하고자 실시하였다. 24시간 명배양, 18시간 명배양과 암배양을 실시하여 세포 성장과 분비된 총단백질, hGM-CSF 생산량을 비교 관찰하였다. 세포의 성장은 24시간 명배양일 때 건조중량이 14.4 g/L로 가장 높았다. 분비된 총단백질의 양은 세가지 경우에서 큰 차이를 관찰할 수가 없었지만, 단위세포당 분비된 총단백질의 양은 암배양이 다른 것에 비해 1.5배 가량 높았다. hGM-CSF의 생산은 18시간 명배양 조건이 가장 좋았으며 최대생산량이 495.5 µg/L에 이르렀다. 또한 분비된 총단백질에서 hGM-CSF가 차지하는 비율은 18시간 명배양이 24시간 명배양에 비해 최대 1.8배 높았다.

### 감 사

본 연구는 과학기술부의 국가지정연구실 사업(2000-N-NL-

C-212)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Larrick, J. W. and D. W. Thomas (2001), Producing proteins in transgenic plants and animals, *Curr. Opin. Biotech.* **12**, 411-418.
- Miele, L. (1997), Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations, *Trends Biotechnol.* **15**, 45-50.
- Doran, P. M. (2000), Foreign protein production in plant tissue cultures, *Curr. Opin. Biotech.* **11**, 199-204.
- Kurata, H., T. Takemura, S. Furusaki, and C. I. Kado (1998), Light-controlled expression of a foreign gene using the chalcone synthase promoter in tobacco BY-2 cells, *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 317-323.
- LaCount, W., G. An, and J. M. Lee (1997), The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures, *Biotechnol. Lett.* **19**, 93-96.
- Magnuson, N. S., P. M. Linzmaier, R. Reeves, G. An, K. HayGlasee, and J. M. Lee (1998), Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture, *Protein Express. Purif.* **13**, 45-52.
- Sehnki, P. C. and R. J. Ferl (1999), Processing of preproinsulin in transgenic tobacco, *Protein Express. Purif.* **15**, 188-195.
- Lee, J. S., S. J. Choi, H. S. Kang, W. G. Oh, K. H. Choi, T. H. Kwon, D. H. Kim, and M. S. Yang (1997), Establishment of a transgenic tobacco cell suspension culture system for producing murine granulocyte-macrophage colony stimulation factor, *Mol. cells*, **7**, 783-787.
- Lee, J. H., N. S. Kim, T. H. Kwon, and M. S. Yang (2001), Effects of osmotic pressure on production of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in plant cell suspension culture, *Enzyme Microb. Tech.* (in press).
- James, E. A., C. Wang, Z. Wang, R. Reeves, J. H. Shin, N. S. Magnuson, and J. M. Lee (2000), Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells, *Protein Expr. Purif.* **19**, 131-138.

11. Hong, S. Y., T. H. Kwon, O. H. Kim, J. H. Lee, Y. S. Jang, and M. S. Yang (2001), Production of biologically active hG-CSF by transgenic plant cell suspension culture, *Enzyme Microb. Tech.* (in press).
12. Terashima, M., Y. Murai, M. Kawamura, S. Nakanishi, T. Stoltz, L. Chen, W. Doran, R. L. Rodriquez, and S. Katoh (1999), Production of functional human  $\alpha_1$ -antitrypsin by plant cell culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 516-523.
13. Terashima, M., Y. Ejiri, N. Hashikawa, and H. Yoshida (1999), Effect of osmotic pressure on human  $\alpha_1$ -antitrypsin by plant cell culture, *Biochem. Eng. J.* **4**, 31-36.
14. Terashima, M., Y. Ejiri, N. Hashikawa, and H. Yoshida (2000), Effects of sugar concentration on recombinant human  $\alpha_1$ -antitrypsin production by genetically engineered rice cell, *Biochem. Eng. J.* **6**, 201-205.
15. John, E. J. R. and N. M. Gough (1994), The cytokine hand book, p.343-369, Academic Press.
16. Gough, N. M., J. Gough, D. Metcalf, A. Kelso, D. Grail, N. A. Nicola, A. W. Burgess, and A. R. Dunn (1984), Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, *Nature* **309**, 763-767.
17. Lee, F., T. Yokota, T. Otsuka, L. Gemmell, N. Larson, J. Luh, K. Arai, and D. Rennick (1985), Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4360-4364.
18. Gasson, J. C. (1991), Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Blood* **77**, 1131-1145.
19. Antman, K. S., J. D. Griffin, A. Elias, M. A. Socinski, L. Ryan, S. A. Cannistra, D. Oette, M. Whitley, E. 3rd Frei, and L. E. Schnipper (1988), Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression, *N. Engl. J. Med.* **319**, 593-598.
20. Champlin, R. E., S. D. Nimer, P. Ireland, D. H. Oette, and D. W. Golde (1989), Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, *Blood* **73**, 694-699.
21. Thompson, J. A., D. J. Lee, P. Kidd, E. Rubin, J. Kaufmann, E. M. Bonnem, and A. Fefer (1989), Subcutaneous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndrome: toxicity, pharmacokinetics, and hematological effects, *J. Clin. Oncol.* **7**, 629-637.
22. Wongsamuth, R. and P. M. Doran (1997), Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots, *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 401-415.
23. Lee, J. H., N. S. Kim, T. H. Kwon, S. M. Park, Y. S. Chang, and M. S. Yang (2001), The effect of sucrose and inoculum size on the production of hGM-CSF from plant cell culture, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 376-380.
24. Kwon, T. H., Y. M. Shin, Y. S. Kim, M. Y. Lee, Y. S. Jang, and M. S. Yang (2001), Secretory production of hGM-CSF with a high specific biological activity by transgenic plant cell suspension culture, *J. Biotechnol.* (in press).
25. Murashige, T. and F. Skoog (1962), A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Plant Physiol.* **15**, 473-479.
26. Kendrick, R. E. and G. H. M. Kronenberg (1994), Photomorphogenesis in Plants, 2nd edn., Kluwer Academic Publishers.
27. Kaldenhoff, R. (1995), Gene expression in plant cell cultures under continuous blue light irradiation of high intensity, *J. Photoch. Photobio. B*, **31**, 97-100.
28. Kim, S. M., I. S. Park, S. Y. Lee, G. W. Lee, and D. I. Kim (1998), Changes of plant cell size index by culture conditions, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**(4), 438-443.
29. Bjoerk, L. (1986), Influence of light on secondary metabolism in plant tissue culture, *Found. Biotech. Ind. Ferment. Res.* **4**, 177-196.
30. Kurata, H., Y. Kaizuka, M. Seki, and S. Furusaki (1999), Mathematical model analyzes light-controlled expression of the CHS promoter in BY-2 cells, *Biochem. Eng. J.* **4**, 65-72.