

오미자의 현탁배양세포로부터 Gomisin J의 생산

황성진^{*†} · 표병식^{*} · 이학주^{**} · 황 백^{***}

^{*}동신대 식품생물공학과, ^{**}국립산림과학원 화학미생물과, ^{***}전남대 생물학과

Production of Gomisin J from Cell Suspension Cultures of *Schisandra chinensis* Baillon

Sung Jin Hwang^{*†}, Byoung Sik Pyo^{*}, Hak Ju Lee^{**}, and Baik Hwang^{***}

^{*}Dept. of Food & Biotechnology, Dongshin Univ., Naju 520-714, Korea.

^{**}Div. of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Res., Seoul, Korea.

^{***}Dept. of Biology, Chonnam Natl. Univ., Kwangju 530-757, Korea.

ABSTRACT : Cell growth and gomisin J production by suspension cultures of *Schisandra chinensis* Baillon were investigated under various culture media, initial sucrose concentrations, shaking speeds, and inoculum sizes. Callus was induced from *in vitro* cultivated leaf segments on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA. The maximum dry cell weight of 2.23 g was obtained at inoculum size of 0.5 g fresh cell weight and in MB5 medium supplemented with 1 mg/l NAA, 3% sucrose after 8 weeks. The production of gomisin J in suspension cell cultures was maximized in WPM medium containing 5% sucrose. The shaking speed for maintaining maximal cell dry weight was 100 rpm while the best shaking speed for gomisin J accumulation was 140 rpm.

Key words : *Schisandra chinensis* Baillon, suspension cell culture, gomisin J

서 언

지금까지 전세계적으로 분리 동정된 약 30,000 종류 이상의 천연물질들 중 80%가 자생식물로부터 유래하고 있으며 (Phillipson, 1990; Balandrin & Klocke, 1988; Fowler & Scragg, 1988), 인구의 75%가 이와 같은 자생 식물 유래 천연물질을 오랫동안 약리적으로 이용하고 있다. 그러나, 자생식물로부터 약리효능을 갖는 천연물질의 획득에 있어서 자생지에서 직접 채취를 하거나 노지에서 재배하는 전래적인 방식은 고부가가치의 약리물질의 대량 생산과 같은 산업화를 위해서는 커다란 장애요인이 되고 있다. 가령, 재배지의 생태환경의 변화에 따라 물질 생산성의 차이를 보이기 때문에 균질화가 어렵고, 특정 물질의 생산성을 높이기 위한 생합성의 조절 또한 불가능하다고

볼 수 있기 때문이다.

식물조직배양 기술은 제어된 환경하에서 식물세포나 조직, 기관등을 배양할 수 있기 때문에 자연조건에 크게 좌우되는 기존의 재배방식에 의한 물질생산의 한계점을 극복할 수 있는 새로운 형태의 기술로 받아들여지고 있다 (Brain, 1976; DiCosmo *et al.*, 1989; DiCosmo & Towers, 1984; Fontanel & Tabata, 1987; Morris *et al.* 1986). 일반적으로 기내 (*in vitro*)에서 배양되는 탈분화된 체세포조직이 모식물체에 비해 이차대사물질의 생산성이 매우 낮게 나타나는 문제점이 있으나 (Endress, 1994; Dornenburg & Knorr, 1995), 배지성분의 변화, 다양한 식물성장조절물질의 처리, pH의 변화, 온도조건의 변화, 교반속도, 산소분압, 그리고 광조건과 같은 다양한 물리화학적 조건들을 최적화 함으로써 오히려 모식물체보다

† Corresponding author : (Phone) +82-61-330-3225 (E-mail) jimhwang@naver.com

Received July 16, 2004 / Accepted November 6, 2004

물질의 생산성을 높인 경우도 많다 (Matsubara *et al.*, 1989; Ulbrich *et al.*, 1985; DiCosmo & Towers, 1984).

오미자 (*Schisandra chinensis*)는 낙엽 활엽 관목으로 충청지역을 제외한 전국에 걸쳐 표고 200~1,600 m에 자생하며, 지리적으로는 한국, 일본, 사할린, 만주, 중국에 분포한다. 민가와 한방에서는 오미자의 열매를 수렴제, 자양제, 강장제, 진해, 구갈(口渴)이나 주독(酒毒)을 푸는데 주로 이용한다. 오미자에서 추출 분리된 주요 성분으로는 citrol, schizandrin, schizandrol, r-schizandrin, gomisin A-H, gomisin J, gomisin K, gomisin O, angeoylgomisin Q, pregomisin 등이 있으며, 이들의 약리 효과로는 항산화작용, 간장해 억제작용, 항암작용, 항균작용, 그리고 중추신경계에 작용하는 것으로 알려지고 있다 (Hancke *et al.*, 1999).

리그난 화합물은 오미자를 비롯한 많은 자원수종의 수피나 종자등에서 발견되어지며, 이와같은 물질은 항암작용을 비롯한 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려지고 있다 (Hancke *et al.*, 1999; Kvasnickova *et al.*, 2001; Sladkovsky *et al.*, 2001). 세포배양에 통하여 리그난 화합물을 생산하려는 연구는 *Ipomoea cairrica* (Paska *et al.*, 1999), *Linum album* (Smolny *et al.*, 1998; Seidel *et al.*, 2002; Empt *et al.*, 2000), *Callitris drummondii* (van Uden *et al.*, 1990c), *Podophyllum hexandrum* (van Uden *et al.*, 1989), 그리고 *Podophyllum peltatum* (Petersen & Alfermann, 2001) 등과 같은 다양한 수종에서 이루어 졌으며, 일부 연구결과에서는 배양조직으로부터 모식물체와 비슷한 수준의 리그난이 생합성되기도 하였다. 본 연구에서는 국내에 자생하는 오미자의 발아 유묘 조직으로부터 켈러스의 유기 및 현탁배양을 위한 최적조건을 탐색하고, 이들 현탁배양세포로부터 약리효과가 우수한 리그난계 화합물질인 gomisin J의 생산성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 종지발아

오미자 (*Schisandra chinensis* Baillon)의 종자는 동신대 종자은행에서 분양받아 종피를 제거한 후 70% ethanol과 0.1% sodium hypochlorite 용액에서 각각 2분간 침지시키고, 무균수로 3회 세척하였다. 이와같이 표면살균 처리된 종자는 멸균된 여과지에서 수분을 제거한 후 식물성장 조절물질이 첨가되지 않은 MS배지 (Murashige & Skoog, 1962)에 치상하여 항온배양실 (광주기 16:8; 26 ± 1°C) 내에서 발아 시켰다. 켈러스 유기를 위하여 발아 후 8주 이상 기내 (*in vitro*)에서 배양된 유묘의 잎과 줄기

를 절취하여 2,4-D, IAA, NAA를 각기 0.5, 1, 2, 3 mg l⁻¹ 농도로 첨가한 MS고형배지 (3% sucrose, pH 5.7)에 치상하고, 암소에서 배양 (26 ± 1°C) 하였으며, 유기된 켈러스는 4주 간격으로 새로운 배지로 계대배양 하여 주었다.

2. 현탁배양

현탁배양에 사용된 배지는 MS (Murashige & Skoog, 1962) 배지, MS배지의 미량원소를 B5배지의 성분으로 교체한 MB5배지, WPM (Lloyd & McCown, 1980) 배지, B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) 배지를 사용하였으며, 탄소원의 농도는 1~7%까지 처리 하였다. 유묘의 조직절편으로부터 유기된 켈러스는 4주간격으로 2회 이상 계대배양한 후 0.1, 0.5, 1, 2 g (FCW)을 각각 취하여 40 ml MB5배지가 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 접종하였다. 모든 현탁배양은 60, 80, 100, 120, 140 rpm 속도로 진탕배양기 (26 ± 1°C) 내에서 수행하였으며, 2주간격으로 1/3 가량을 새로운 배지로 교환해주었다. 현탁배양세포의 균질화를 위해 초기 계대배양 과정에서 stainless steel filtration chamber (pore size 50, 100 μm)를 이용하여 새로 형성된 동일한 크기의 세포군 만을 수집하여 새로운 배지로 옮겨 배양 하였다.

3. 세포 성장률의 측정

세포의 성장률은 8주 동안 배양된 현탁배양세포를 여과지에서 24시간 탈수 시킨 뒤 측정된 생중량 (fresh cell weight; FCW)과 냉동건조기에서 48시간 건조한 후 측정된 건물중량 (dry cell weight; DCW)으로 나타내었다.

4. 물질분석

오미자의 현탁배양세포로부터 gomisin J의 분석은 8주 배양된 세포를 수집하여 냉동건조 후 막자사발에서 마쇄한 다음 분말시료 0.5 g에 메탄올 70 ml을 가하여 수욕상에서 3회 가열하여 추출하였다. 3회 연속 같은 방법으로 얻은 메탄올 추출물을 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상정액을 Table 1과 같은 조건하에서 HPLC (Shimazu,

Table 1. Operational conditions of HPLC for analysis of Gomisin J in suspension cell cultures of *Schisandra chinensis*.

Instrument	HPLC (Shimazu, Tokyo, Japan)
Column	Cellpak C18
Mobile phase	Acetonitrile : water (1:1)
Flow rate	1 ml/min.
Detection	UV 252 nm
Sensitivity	0.05 AUFS

Tyokyo, JAPAN)를 이용하여 분석하였다. Gomisin J의 정량분석을 위한 표준시료는 임업연구원에서 단리한 것을 분양 받아 사용하였다.

5. 통계처리

통계처리는 SAS (Statistical analysis system) package를 이용하여 ANOVA test를 시행한 후 유의수준 $p < 0.05$ 범위에서 결과들의 평균에 대한 표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 캘러스 배양

오미자의 유묘 조직절편으로부터 캘러스를 유기하기 위하여 MS 기본배지에 오옥신류를 농도별로 단독 처리하였을 때 3 mg/l 이상의 농도로 오옥신을 처리하였을 경우와 2,4-D 처리구, 그리고 IAA의 단독 처리구에서는 캘러스의 유기가 거의 이루어지지 않았으며, 유기된 캘러스 또한 3주 후부터 갈변화되는 현상을 보여주었다. 오옥신에 BA를 혼합하여 처리했을 경우에는 오옥신을 단독으로 첨가한 것과 별다른 차이점을 확인할 수 없었다 (data not shown). 이에비해 NAA의 처리구에서는 뿌리를 제외한 잎과 줄기의 조직절편에서 캘러스가 형성 되었다 (Table 2). 캘러스 유기율은 1 mg/l NAA를 단독으로 처리한 실험구에서 98.2%로 가장 높았으나 3 mg/l 이상에서는 부정근

이 분화 되기도 하였다. 일주일 후 모식물의 조직절편으로부터 캘러스를 분리하여 동일조성의 배지로 옮겼을 때 지속적으로 캘러스의 증식을 확인할 수 있었다. 모식물의 조직절편으로부터 탈분화를 유도하는데 있어서 가장 중요한 요인은 내재된 오옥신과 시토키닌의 함량, 그리고 배지에 첨가하는 식물성장조절물질의 농도의 비율로 보고 있다. 오옥신을 배지에 단독처리할 경우 조직절편에서 부정근이 형성되는 현상을 볼 수 있기도 하지만 내제호르몬의 함량에 따라 2,4-D의 단독 처리만으로 캘러스가 유기 되기도 한다. 오미자의 경우 잎과 줄기에서 그리고 줄기의 방향에 따라서 캘러스의 형성에 있어서 약간의 차이가 나타남을 확인할 수 있었다. 그러나, 배지내에 첨가하는 sucrose의 농도 (1~5%)나 pH (5.2~6.0)에 의해서는 캘러스의 유기에 크게 영향을 주지 않는 것으로 보였다 (data not shown).

2. 현탁배양

고형배지에서 증식된 캘러스를 4주간격으로 2회 이상 계대배양한 후 2 g (F.W)을 취하여 40 ml MS배지가 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 접종하였다. 현탁배양된 세포의 균질화를 위해서 계대배양 과정에서 stainless steel filtration chamber (pore size 50, 100 μm)를 이용하여 새로 형성된 동일한 크기의 세포군 만을 수집하여 실험에 사용하였다 (Fig. 1). 캘러스배양은 물론 현탁배양에서 세포의 성장과 물질의 생산에 영향을 주는 가장 기본적인 요인중의 하나가 배지의 성분이다 (Stuatr & Street, 1969; Sakato & Misawa, 1974; Mori et al., 1994; Sakurai & Mori, 1996). 오미자 현탁배양시 세포의 성장과 물질의 생합성에 적합한 배지를 선별하기 위하여 1 mg/l NAA가 첨가된 MS배지와 MS배지의 미량원소를 B₅배지의 성분으

Table 2. Callus formation on MS medium containing various auxins concentration.

Auxins (mg l ⁻¹)	Callus formation (%)		
	Leaf	Stem	Root
IAA	0.5	ND	ND
	1.0	ND	ND
	2.0	11.4 ^R	ND
	3.0	72 ^R	ND
NAA	0.5	23.1	ND
	1.0	97.3	32.1
	2.0	61.4	48.3
	3.0	18.3 ^R	11.4
2,4-D	0.5	ND	ND
	1.0	ND	ND
	2.0	ND	ND
	3.0	ND	ND

* Each value represents the mean of three independent determinations.
 * -ND not detectable: ^R rooting

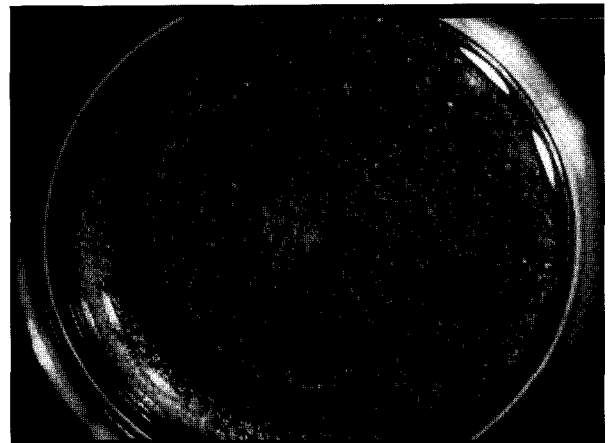


Fig. 1. Embryogenic cell suspension cultures of *S. chinensis*.

로 교체한 MB5배지, WPM배지, 그리고 B5배지 각각을 100 ml Erlenmeyer flask에 40 ml씩 넣고 켈러스 0.5 g (D.W)씩을 접종하여 교반형 배양기에서 진탕배양 하였다. 배양 8주 후 성장률은 MS배지 보다 무기염의 조성을 변화시킨 MB5배지가 가장 좋은 것으로 나타났으며, 물질의 생산성은 WPM배지에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 2, 3). 한편, 초기접종 농도에 의한 세포의 증식은 0.1 g (D.W)이하의 양을 접종시 성장기의 진입 속도가 0.5 g 이상으로 시작하였을 때 보다 1~2주 늦어지는 양상을 보여주었으며, 2 g 이상을 접종할 경우에는 4주 후 세포의 성장이 정체되는 양상을 보여주었다 (Fig. 4). 세포의 현탁배양 시 초기접종 농도는 세포의 초기 성장곡선의 변화와 물질의 생산성에 있어서 매우 중요한 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다. van Gulik 등 (1994)은 *Catharanthus roseus*의 현탁배양에서 초기 접종 농도가 낮을 경우 세포

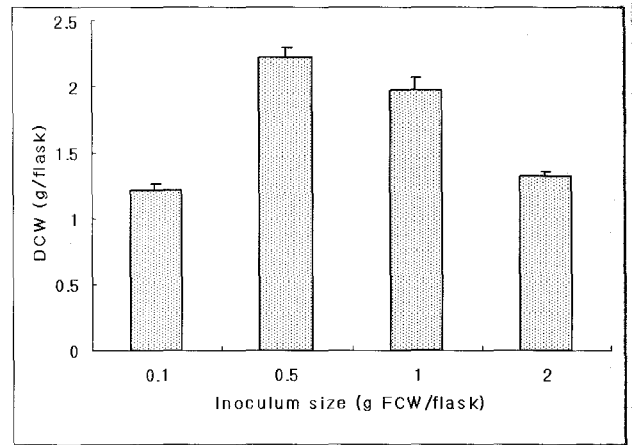


Fig. 4. Effects of inoculum size on dry biomass accumulation in flask cultures of *S. chinensis*.

의 성장이 크게 지연되었으며, Zhong 등 (1995)과 Su & Lei (1993)는 *Perilla frutescens*와 *Anchusa officinalis* 현탁배양에서 적정 수준의 초기 접종 농도가 물질의 생산성에 중요한 요인으로 작용함을 확인한 바 있다.

3. 탄소원

현탁배양세포는 타가영양적 성장을 하기 때문에 세포의 성장과 물질의 생합성은 배지에 첨가하는 탄소원의 농도에 크게 좌우되는 경우가 많으며, 탄소원의 농도에 의해 배양세포의 삼투가 조절되기 때문에 배양과정에서 적정 수준의 탄소원을 반드시 첨가해 줄 필요가 있다 (Do & Cormier, 1990; Mukherjee et al., 1991). 오미자 현탁배양세포의 경우 기본배지내 탄소원의 농도를 1%에서 7%까지 높여주면서 8주 동안 배양 하였을 때 세포의 성장은 3%에서 2.23 g DCW, gomisin J의 생산성은 5%에서

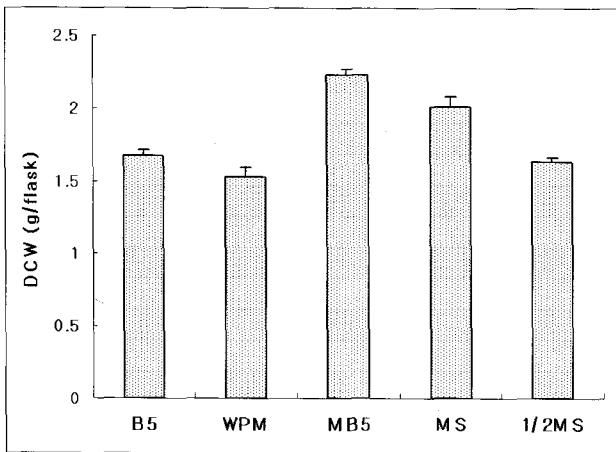


Fig. 2. Effects of various media on dry biomass accumulation in flask cultures of *S. chinensis* cultures.

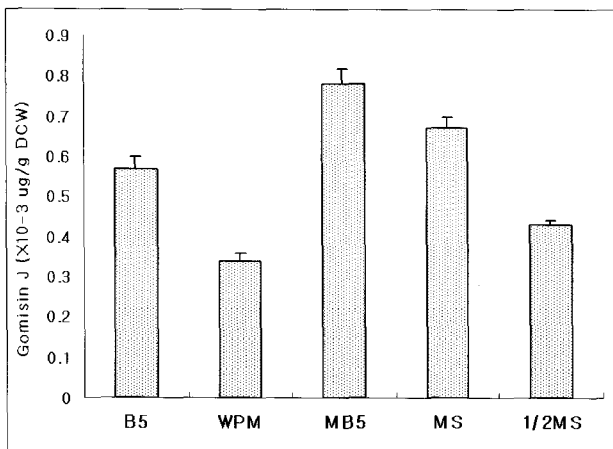


Fig. 3. Effects of various media on gomisin J contents in flask cultures of *S. chinensis*.

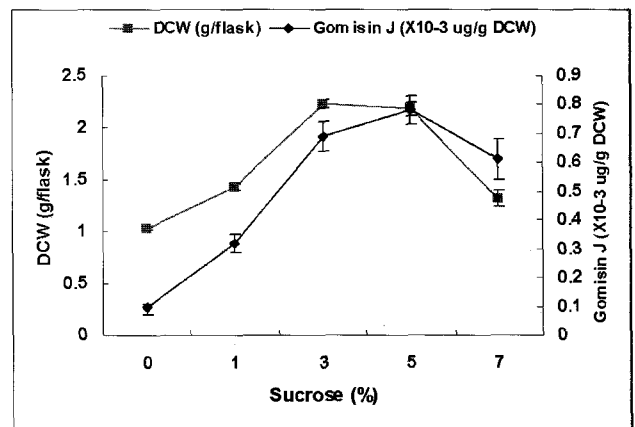


Fig. 5. Effects of sucrose concentration on dry biomass accumulation and gomisin J contents in flask cultures of *S. chinensis*.

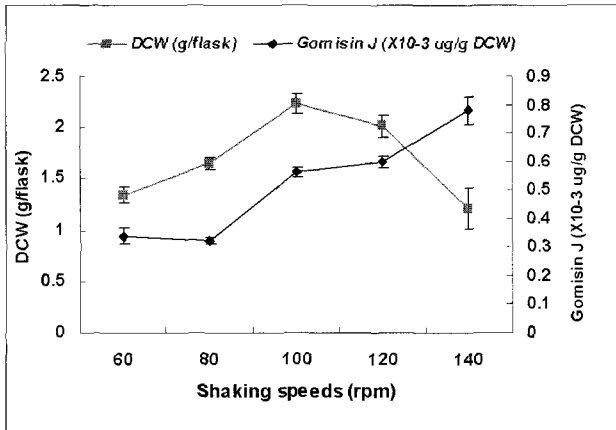


Fig. 6. Effects of shaking speeds on on dry biomass accumulation and gomisin J contents in flask cultures of *S. chinensis*.

$0.78 \times 10^{-3} \mu\text{g/g DCW}$ 으로 각각 가장 높게 나타났다 (Fig. 5). 현탁세포배양 시 물질의 생산성을 극대화 시키기 위해서 7~12% 까지 배지내에 첨가하는 경우도 있으나 (Misawa, 1985; Knobloch & Berlin, 1980; Berlin *et al.*, 1983), 일부 식물종에서는 5% 이상에서 물질의 생산성이 저하현상을 나타내는 경우도 있다 (Sakamoto *et al.*, 1993).

4. 교반속도

식물세포의 현탁배양 시 적정 속도의 교반은 세포의 증식과정에서 침적을 억제하고 산소 공급을 원활하게 해주기 때문에 세포의 빠른 성장을 위해 반드시 적정 수준이 유지되어야 한다. 유용물질은 대부분 물리화학적인 자극에 대한 방어작용에 관련되는 것들이 많기 때문에 배양과정에서 교반은 세포에 물리적인 자극을 줌으로써 생합성을 촉진 할 수 있다 (Zhong *et al.*, 1992). 오미자의 현탁배양 시 100 rpm에서 세포의 성장에 적절한 속도로 보였으며, gomisin J의 생산성을 높이기 위해서는 140 rpm을 유지해야 할 것으로 생각되었다 (Fig. 6). 이와같은 조건하에서 gomisin J의 생산성은 $0.79 \times 10^{-3} \mu\text{g/g DCW}$ 이었다. 이는 Wu 등 (2003)이 *Rhodiola sachalinensis*의 세포의 현탁배양 과정에서 건물중량은 교반속도 100 rpm에서, 그리고 물질의 생산성은 150 rpm에서 최적임을 확인한 보고와 같은 결과로 생물반응기에서의 연속배양 시 고려되어야 할 사항으로 사료 되었다.

사 사

본 연구는 2001년도 농림기술개발 기획연구과제와 바이오그린 21 사업 연구비 지원에 의해 수행 되었음

LITERATURE CITED

- Balandrin MJ, Klocke JA (1988) Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. (In Bajaj YPJ eds.) Biotechnology in agriculture and forestry. Medicinal and aromatic plants, vol. 4. Springer-Verlag, Berlin, p. 1-36.
- Berlin J, Forche E, Wray V, Hammer J, Hosel W (1983) Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. Z. Naturforsch 38:346-352
- Brain KR (1976) Accumulation of L-DOPA in cultures from *Macuna pruriens*. Plant Sci. Lett. 7:157-161.
- DiCosmo F, Facchini PJ, Kraml MM (1989) Cultured plant cells—the chemical factory within. Chemistry in Britain 25:1001-1004.
- DiCosmo F, Towers GHN (1984) Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. In Phytochemical adaptations to stress (Timmermann BN, Steelink C, Loewus FA eds.) Plenum press, NY, p. 97-175.
- Do CB, Cormier F (1990) Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. Plant Cell Rep. 9:143-146.
- Domenberg H, Knorr D (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolites production in plant cell cultures. Enzyme Microbe. Technol. 17:674-684.
- Endress R (1994) Plant cell biotechnology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p. 121-242.
- Fontanel A, Tabata M (1987) Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Nestle Research News 1986/87:92-103.
- Fowler MW, Scragg A (1988) Natural products from higher plants and plant cell culture. (In Pais MSS, Mavituna F, Novais JM eds.) Plant cell biotechnology. NATO ASI Series, vol. 18. Springer-Verlag, Berlin, p. 165-177.
- Gamberg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:148-151.
- Hancke JL, Burgos RA, Ahumada F (1999) *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. FITOTERAPIA 70:451-471.
- Knobloch KH, Berlin J (1980) Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L. Z. Naturforsch 35C:551-556.
- Kvasnickova L, Glatz Z, Sterbova H, Kahle V, Slanina J, Musil P (2001) Application of capillary electrochromatography using macroporous polyacrylamide columns for the analysis of lignanas from seeds of *Schisandra chinensis*. J. Chromatography A, 916:265-271.
- Lloyd GB, McCown BH (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot top culture. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:421-437.
- Matsubara K, Shigekazu K, Yoshioka T, Morimoto T, Fujita Y, Yamada Y (1989) High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. J. Chem. Tech, Biotech. 46:61-69.
- Misawa M (1985) Production of useful plant metabolites. In

- Fiechter A eds. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. Berlin, Springer-Verlag p. 59-88.
- Mori T, Sakurai M, Furusaki S (1994) Effects of conditioning factor on anthocyanin production in strawberry suspension cultures. J. Sci. Food Agric. 66:381-388.
- Morris P, Scragg AH, Stafford A, Fowler MW (eds.)(1986) Secondary metabolism in plant cell cultures. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mukherjee SK, Sabapathi RB, Gupta N (1991) Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. Plant Cell Tissue Org Cult 25:13-16.
- Murashige T, Skoog F (1969) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Paska C, Innocenti G, Kunvari M, Laszlo M, Szilagyi (1999) Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. Phytochemistry 52:879-883.
- Petersen M, Alfermann AW (2001) The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. App. Microbiol. Biotechnol. 55:135-142.
- Phillipson JD (1990) Plants as source of valuable products. (In Charlwood BV, Rhodes MJC eds.) Secondary products from tissue culture. Oxford : Clarendon Press. p. 1-21.
- Sakamoto K, Iida K, Sawamura K, Hajiro K, Asada Y, Yoshikawa T, Furuya T (1993) Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*. Phytochemicals 33:357-360.
- Sakato K, Misawa M (1974) Effects of chemical and physical conditions on growth of *Camptotheca acuminata* cell cultures. Agric. Biol. Chem. 38:491-498.
- Sakurai M, Mori T (1996) Stimulation of anthocyanin synthesis by conditioned medium produced by strawberry suspension cultures. J. Plant Physiol. 149:599-604.
- Scragg AH, Allan EJ, Leckie F (1988) Effects of shear on the viability of plant cell suspensions. Enzyme. Microbe. Technol. 10:361-367.
- Seidel V, Windhovel J, Eaton G, Alfermann AW, Arroo RRJ, Medarde M, Petersen M, Woolley JG (2002) Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. Planta 215: 1031-1039.
- Sladkovsky R, Solich P, Opletal L (2001) Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and (E)-cinamic acid in vegetative organs of *Schisandra chinensis* by HPLC. J. Pharm. & Biochemical Analysis 24:1049-1054.
- Smolny T, Wichers H, Kalenberg S, Shahsavari A, Petersen M, Alfermann AW (1998) Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. Phytochemistry 48:975-979.
- Stuart R, Street HE (1969) Studies on the growth in culture of plant cells. IV. The initiation of division in suspensions of stationary phase cells of *Acer pseudoplatanus* L. J. Exp. Bot. 20:556-571.
- Su WW, Lei F (1993) Rosmarinic acid production in perfused *Anchusa officinalis* cultures: Effects of inoculum size. Biotechnol. Lett. 15:1035-1038.
- van Gulik WM, Nuutila AM, Vinke KL, ten Hoopen HJG, Heijnen JJ (1994) Effects of carbon dioxide, air flow rate, and inoculum density on the batch growth of *Catharanthus roseus* cell suspension in stirred ferments. Biotechnol. Prog. 10:335-339.
- Wu S, Zu Y, Wu M (2003) High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*. J. Biotechnology 106:33-43.
- Zhong JJ, Seki J, Kinoshita S, Yoshida T (1992) Physiological characteristics of cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens*. Biotechnol. Bioeng. 40:1256-1262.
- Zhong JJ, Yoshida T (1995) High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production : Effects of sucrose concentration and inoculum size. Enzyme Microb. Technol. 17:1073-1079.