

함박꽃나무의 현탁배양세포로부터 (+)-Eudesmin의 생산을 위한 최적화

황 성 진

동신대 한약재산업학과

(접수 : 2004. 8. 20., 게재승인 : 2005. 2. 10.)

Optimization of Culture Conditions for the (+)-Eudesmin Production in *Magnolia sieboldii* Cells

Sung Jin Hwang

Department of Oriental Medicine Materials, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

(Received : 2004. 8. 20., Accepted : 2005. 2. 10.)

In order to product the furofuranoid lignans, (+)-eudesmin which is one of the secondary products from *Magnolia sieboldii*. through cell suspension cultures; various culture media, initial sucrose concentration, elicitations, shaking speeds, and inoculum sizes. Among the culture media tested, MS medium had a pronounced effect on suspension cell growth and (+)-eudesmin contents. The maximum dry cell weight (DCW) of 3.71 g per flask was obtained at inoculum size of 0.5 g and in MS medium supplemented with 3% sucrose plus 0.5 mg/L 2,4-D after 8 weeks. (+)-Eudesmin biosynthesis was stimulated with high initial sucrose concentration, and the maximum (+)-eudesmin production of 3.2 µg/g DCW was achieved at 200 mg/L chitosan and 5% initial medium sucrose. The optimal shaking speeds for dry biomass accumulation and (+)-eudesmin contents was 130 rpm. This work is considered to be helpful for large-scale bioprocessing of *Magnolia sieboldii* suspension cell cultures in bioreactor.

Key Words : *Magnolia sieboldii*, suspension cell cultures, (+)-eudesmin

서 론

대부분 이차대사 경로를 통하여 소량으로 생합성되는 식물 유래 천연 약리소재를 상업적으로 생산하는데 있어서 탈분화된 체세포를 사용하는 것보다는 체세포배(somatic embryos)나 부정근, 또는 유묘와 같은 분화된 조직을 이용하는 것이 비교적 효율적 일 수 있다. 그러나, 기관배양의 경우에는 배가시간에 도달하는 속도가 늦고, 물질 생합성에 있어서 기관 특이성이 나타날 수 있다거나 배양체로부터 물질의 회수가 쉽지 않다는 단점이 있다. 이에 비해 체세포배양은 우량 세포주 (cell lines)의 선발이 용이하고, 모식물체에서 생산되지 않은 물질의 획득 가능성이 있으며, 생물변환 (biotransformation)과 같은 대사조절이 용이하다. 또한, 배양과정에서 외부 환경의 변화 가령, 배지성분, 다양한 식물성장조절물질 (PGRs)의 투입, 적정 pH의 조정과 같은 화학적인 배양조건들과 초기 접종농도,

배양 온도, 교반속도, 산소분압, 그리고 광조사와 같은 물리적인 배양조건들에 대해 보다 직접적이고 쉽게 반응을 보임으로써 물질의 생산성을 조기에 극대화 할 수 있다는 점이 기관배양에 비해 유리하다고 볼 수 있겠다(1-6).

목련과 (Magnoliaceae) 식물로부터 분리된 물질들 중 약리효능을 검증받은 대표적인 생리활성물질로는 *M. fargesii*, *M. officinalis*, *M. denudata*, 그리고 *M. liliflora*으로부터 분리된 magnolol, honokiol, magnoshinin, 그리고 magnosalin 등이 있다(7, 8). 특히, 목련과 식물을 포함한 일부 수종에서 발견되어지는 리그난 화합물은 항암작용을 비롯한 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려지고 있다(9, 10). 세포배양을 통하여 이와 같이 약리소재로 활용이 가능한 리그난 화합물을 생산하려는 연구는 *Ipomoea cairrica*(11), *Linum album*(12, 13), *Callitris drummondii*(14), 그리고 *Podophyllum peltatum*(15) 등에서 이루어진 바 있으며, 일부 연구결과에서는 모식물체와 같은 수준의 리그난계열의 화합물이 생합성되기도 하였다.

목련과 식물인 함박꽃나무는 전국에 걸쳐 표고 50-1,400 m 지역에 자생하며, 지리적으로는 한국, 일본, 중국에 분포한다. 방향성식물로 5-6월에 개화하여 9월경에 열매를 맺고 민가에서는 전래적으로 수피와 근피를 건위, 구충 등

† Corresponding Author : Department of Oriental Medicine Materials, Dongshin University, Naju 520-714, Korea
Tel : +82-61-330-3225, Fax : +82-61-330-3309
E-mail : botany@dsu.ac.kr

의 약용으로 이용하여 왔다. 다른 목련과 수종에 비해 함박꽃나무는 함유물질이나 생리활성 검정 연구가 매우 미흡한 편이다. 지금까지 함박꽃나무로부터 분리된 주요 성분으로는 수피로부터 sesquiterpene lactone, costunolide, 15-acetoxycostunolide, 잎에 magnoporphine, 그리고 꽃잎에서 essential oils 등이 있으나(16-19), 배양세포로부터 이와 같은 생리활성물질의 생산성을 검정한 연구결과는 보고된 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 함박꽃나무로부터 유래한 체세포의 현탁배양을 통하여 생리활성물질인 furofuranoid lignan (+)-eudesmin의 생산을 위해 다양한 배양조건 하에서 실험한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

세포주의 선발

함박꽃나무 (*Magnolia sieboldii* Koch.)의 캘러스는 충북대 임산자원학부에서 유기한 것을 분양받아 0.5 mg/L 2,4-D가 포함된 MS배지(20)(3% sucrose, pH 5.7)에 치상한 후 암소에서 4주간격으로 계대배양($26 \pm 1^\circ\text{C}$)을 통하여 증식시켰다. 계대배양된 캘러스는 동일조성의 액체배지에 접종하여 4주간 전배양 (pre-culture)을 수행한 후 3주 간격으로 stainless steel filtration chamber (pore size 50, 100 μm)를 이용하여 새로 형성된 동일한 크기의 세포군만을 수집한 후 0.1% Phytigel (Sigma, USA)가 첨가된 semi-solid 배지에 치상하여 세포군 (colony)의 형성 속도에 따라 세포주를 선발 하는 방식으로 이루어졌다.

현탁배양

세포의 성장과 물질의 생산성에 적합한 기본배지를 선정하기 위하여 MS배지, 무기염의 농도를 절반으로 낮춘 1/2 MS배지, SH배지(21), WPM배지(23), 그리고 B₅배지(24)를 사용하였으며, 탄소원인 sucrose의 농도는 1%에서부터 7% 농도까지 기본배지에 첨가 하였다. 배가시간 (doubling time)과 회분배양 (batch culture) 후 물질의 생산성에 미치는 초기 접종 농도의 영향을 조사하기 위해서 균질화된 세포를 약 0.1, 0.5, 3, 그리고 5 g (FCW)씩 40 ml 배지가 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 접종하였으며, 교반속도는 60, 100, 130, 그리고 150 rpm 속도로 각기 조정하여 사용하였다. 또한, 지표물질의 생합성에 있어서 elicitation 작용 효과를 조사하기 위해 chitosan (Sigma, USA)를 Chang과 Lee(1992)의 방법(24)에 따라 준비한 후 배양 3주 후에 농도별로 처리하였다.

세포 성장률의 측정

세포의 성장률은 8주 동안 배양된 현탁배양세포를 여과지에서 24시간 탈수 시킨 뒤 측정된 생중량 (FCW)과 냉동건조기 (Eyela, Japan)에서 48시간 건조한 후 측정된 건조중량 (DCW)으로 나타내었다.

물질분석

함박꽃나무의 현탁배양세포로부터 리그난 성분의 분석은 8주 배양된 세포를 수집한 다음 냉동건조시켜 막자사

발에서 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, Tyokyo, JAPAN)를 이용하여 분석하였다(25). (+)-Eudesmin의 표준시료는 임업연구원에서 단리한 것을 분양받아 사용하였다.

Table 1. Operational conditions of HPLC for analysis of (+)-eudesmin in suspension cell cultures of *M. sieboldii*

Instrument	HPLC (Shimazu, Tokyo, Japan)
Column	Cellpak C ₁₈
Mobile phase	EtOH : n-Hexane(1:1)
Flow rate	0.5 ml/min
Detection	280 nm
Sensitivity	0.05 AUFS

결과 및 고찰

세포주의 선발

고형배지에서 증식된 캘러스를 동일조성의 액체배지에 접종하여 4주 간격으로 계대배양 하면서 8주 이상 전배양 (pre-culture)을 수행하였다. 이 과정에서 3주 간격으로 stainless steel filtration chamber (pore size 50, 100 μm)를 이용하여 새로 형성된 동일한 크기의 세포군만을 반복적으로 수집하였으며, 이들을 액체배지에 희석한 후 0.1% Phytigel가 첨가된 semi-solid 배지에 치상하였다. 6주 동안 암배양을 통하여 세포군을 형성하는 속도에 따라 M-01, M-17, M-21을 1차로 선발하였으며, 이들 중 M-21 세포주를 고형배지에서 재증식 후 동일조성의 액체배지로 옮겨 현탁배양을 하였다. M-21 세포주는 현탁배양을 통하여 동일한 방법으로 4종의 세포주를 재선발하고 이들 중 성장속도가 가장 빠른 M-219를 이후 모든 실험에 사용하였다.

배지조건

세포의 성장과 물질의 생산성에 적합한 기본배지를 선정하기 위하여 0.5 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지, 1/2MS배지, SH배지, WPM배지, 그리고 B₅배지에 각각 M-219 세포를 접종하였다. 배양 8주 후 생중량과 건조중량을 측정된 결과 MS배지에서 가장 높았으며, (+)-eudesmin의 생합성 또한 MS배지에서 다른 4종의 배지조건에 비해 가장 좋은 결과를 보여주었다(Fig. 1, 2). 이와 같이 배지의 조성은 많은 식물종의 세포배양에서 세포의 성장과 물질대사에 영향을 미치는 주요 요인으로 작용하게 된다(26-29). 또한, 타가영양적 성장을 하게 되는 현탁배양세포들에게는 외부에서 에너지원인 탄소원을 다량으로 공급해 주어야 한다. 배지 성분에 포함시켜 공급 받게 되는 당은 세포의 구성성분과 에너지원으로 이용되어 세포의 성장을 가져오고 액체배양에서는 삼투조절 작용까지 하게 된다. 이러한 이유로 세포 배양 과정에서 초기에 적정 농도의 탄소원의 종류와 농도가 설정되어야 한다. 특히 연속배양을 수행할 경우에는 세포의 성장곡선과 대비되어 급격히 소모되는 배지내 탄소원의 농도를 지속적으로 유지시켜 주어야만 한다(30). 함

박꽃나무의 현탁배양에 있어서는 탄소원으로 sucrose를 사용 하였으며, MS배지에 1%에서 7%까지 농도를 달리 처리한 후 8주 동안 배양하였다. 세포의 생중량은 3%에서 3.65 g DCW/flask였으며, 물질의 생산성의 경우 5% 농도에서 1.82 ug/g (DCW)으로 각각 나타났다(Fig. 3, 4). 현탁세포배양에서 물질의 생산성을 극대화시키기 위해서 7% 이상 12%까지 고농도로 처리해 주는 경우도 있으나(31-33), 이와 달리 5% 이하의 저농도 처리를 통하여 물질의 생산성에 대한 효과를 기대하는 경우도 있다(34). 본 실험의 경우처럼 세포의 성장은 저농도에서 물질의 생산성은 이보다 높은 농도에서 이루어지는 경우도 있으나, 세포의 성장과 물질의 생산성이 동일 농도에서 최대치를 나타내기도 한다. 초기 당농도에 의한 세포의 성장과 물질의 생산성의 차이가 심한 경우에는 2단계 배양방식을 취하여 세포성장을 최대치까지 끌어 올린다음 물질의 생합성을 극대화할 수 있도록 배지내 당 농도를 변화시키는 게 바람직하다.

초기접종 농도

식물세포의 현탁배양에 있어서 초기 접종 농도를 어떻

게 설정해 주는가에 따라 세포의 성장곡선의 변화가 나타나게 된다. 특히 scale-up 과정에서는 초기접종 농도는 단위 시간당 생중량의 변화에 매우 중요한 요인으로 작용하는 경우가 많다. 함박꽃나무의 현탁배양세포를 100 ml 용량의 플라스크에서 8주간 회분배양을 한 결과 초기 접종 농도를 0.1 g (DCW) 이하로 할 경우에는 성장기의 진입 속도가 0.5 g (DCW) 이상 농도로 접종하였을 때보다 1주일 정도 늦어지는 경향을 보여주었으며, 2 g (DCW) 이상 고농도로 접종할 경우에는 4주 후 세포의 성장이 정체되는 양상을 보여주었다(data not shown). 8주 동안 배양한 다음 생산성을 비교해 보았을 때 초기접종 농도를 0.5 g (DCW)으로 하는 게 가장 적합한 것으로 나타났다(Fig. 5). van Gulik 등(1994)은 *Catharanthus roseus*의 현탁배양에서 초기 접종 농도가 낮을 경우 세포의 성장속도 곡선의 변화가 크게 지연됨을 확인한 바 있고(35), Zhong등(1995)과 Su와 Lei(1993)도 *Perilla frutescens*와 *Anchusa officinalis* 현탁배양에서 적정 수준의 초기 접종 농도를 확인함으로써 물질의 생산성을 최대로 얻은 바 있다(36, 37).

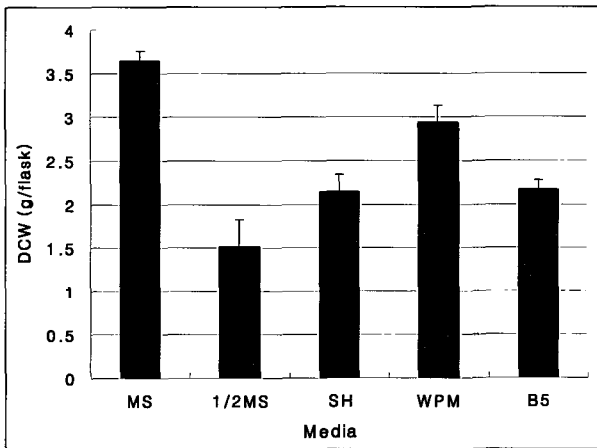


Figure 1. Effects of variuos media on dry biomass accumulation in flask culture of *M. sieboldii*.

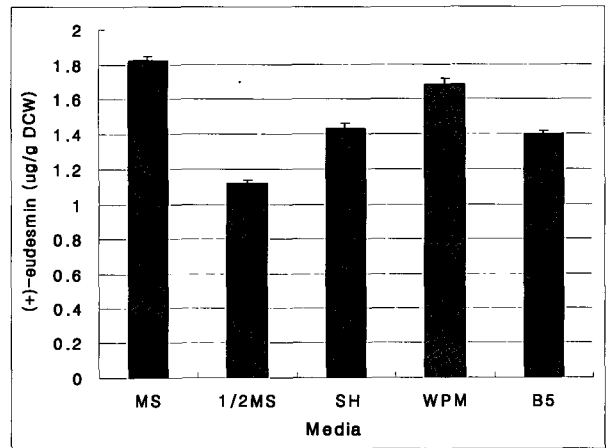


Figure 2. Effects of variuos media on (+)-eudesmin contents in flask culture of *M. sieboldii*.

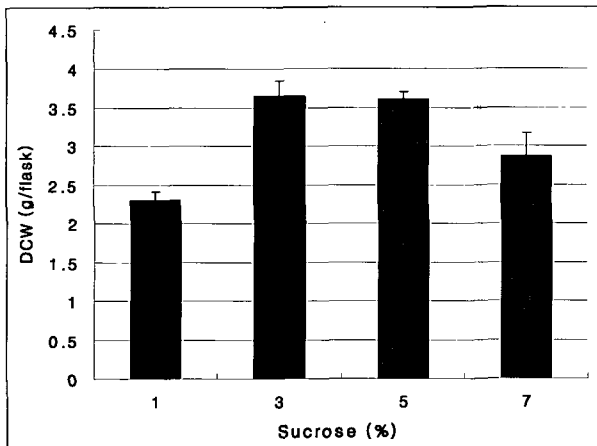


Figure 3. Effects of initial sucrose concentration on dry biomass accumulation in flask culture of *M. sieboldii*.

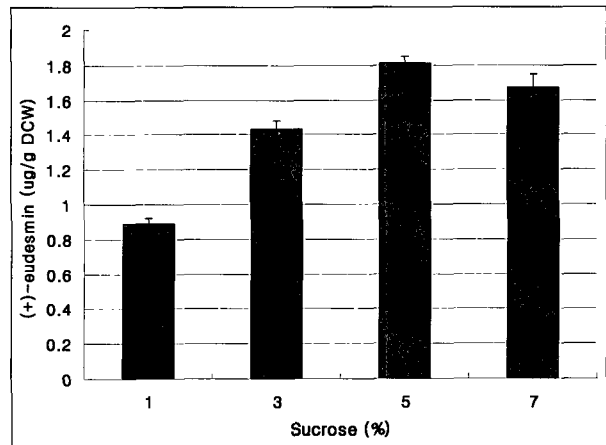


Figure 4. Effects of initial sucrose concentration on (+)-eudesmin contents in flask culture of *M. sieboldii*.

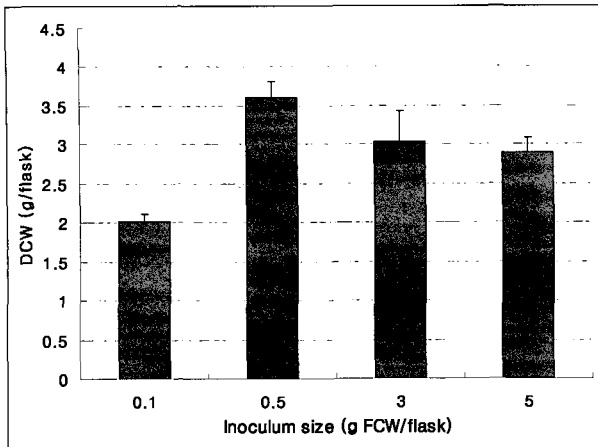


Figure 5. Effects of inoculum size on dry biomass accumulation in flask culture of *M. sieboldii*.

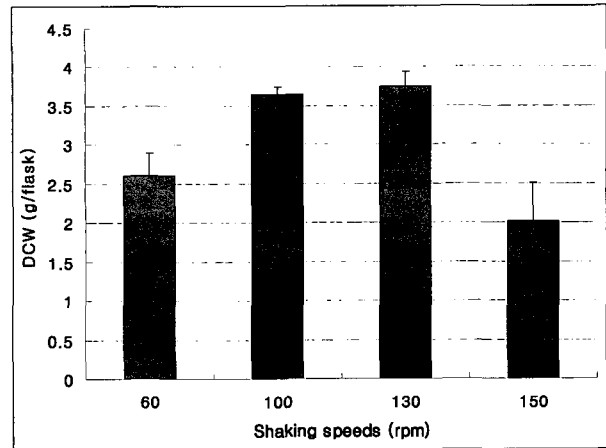


Figure 6. Effects of shaking speeds on dry biomass accumulation in flask culture of *M. sieboldii*.

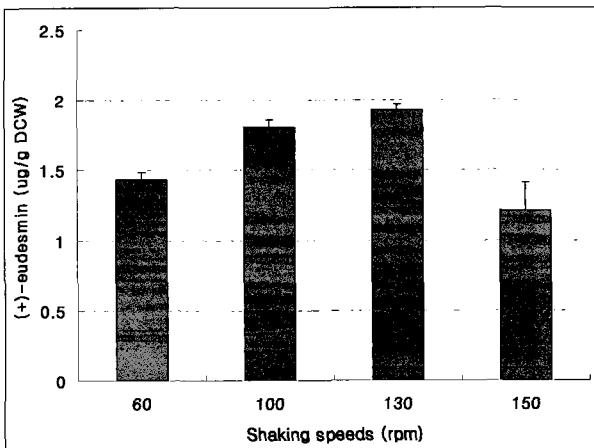


Figure 7. Effects of shaking speeds on (+)-eudesmin contents in flask culture of *M. sieboldii*.

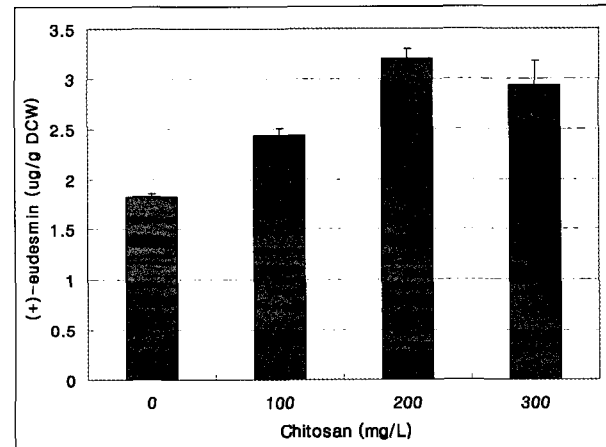


Figure 8. Effects of chitosan on (+)-eudesmin contents in flask culture of *M. sieboldii*.

교반속도

식물세포의 현탁배양에서 교반속도는 세포의 증식에 따른 침하를 억제하고, 산소 공급을 원활하게 해주기 때문에 세포의 빠른 성장을 위해 반드시 적정 수준이 유지되어야 한다. 또한, 유용물질은 대부분 이차대사산물로 물리화학적 자극에 대한 방어작용에 관련되는 것들이 많기 때문에 배양과정에서 교반은 세포에 적당한 수준의 물리적인 자극 (shear effects)을 줌으로써 생산성을 촉진하게 된다 (38). 함박꽃나무의 현탁배양에서는 세포의 성장과 물질의 생산성을 위해서 교반속도를 130 rpm으로 유지시켜주는 게 바람직할 것으로 보였다(Fig. 6, 7). 본 실험에서처럼 현탁배양에서 세포의 성장과 물질의 생산성 모두에 동일한 수준의 교반속도가 필요한 경우도 있으나, Wu 등(2003)이 *Rhodiola sachalinensis*의 세포를 가지고 수행한 실험에서 나타난 것처럼 세포증식과 물질의 생산성을 위한 교반속도가 다르게 요구되는 경우도 있다(39). Wu 등(2003)도 최대 건물중량을 교반속도 100 rpm에서 물질의 생산성은 이보다 빠른 속도인 150 rpm에서 얻은 바 있다(40).

Elicitation

식물세포는 감염이나 상처, 스트레스 등에 의해서 내외

부적으로 다양한 방어시스템이 작동하게 된다. 이와 같은 방어기작들 중 이차대사과정을 통하여 만들어지는 소량의 방어물질들이 천연소재로써 활용되어지고 있다. 서식지의 환경조건에 따라 변화를 보이는 이차대사물질의 생산성 때문에 기내 (*in vitro*)에서 세포나 조직의 배양을 통하여 유용물질을 생산하는 과정에서도 곰팡이의 세포벽 추출물이나 효모 추출물, MeJA, 또는 chitosan과 같은 외부자극 유도물질을 적절히 활용하고 있다. James 등(1993)은 *Terygium wilfordii*의 세포배양에서 Gregoria와 Victor(1970)는 *Catharensis roseus*의 종양조직의 배양에서 곰팡이 세포벽 추출물을 처리하여 alkaloids와 색소물질의 생산성을 촉진시키도록 한 바 있다(40, 41). Chitosan은 β -1,4-glucosamine 중합체로 식물세포에 작용하여 대사에 영향을 주는 것으로 보고된 바 있다(42). 함박꽃나무의 현탁배양에서는 배양 3주 후에 각 실험구별로 chitosan을 100, 200, 그리고 300 mg/L의 농도로 배양액에 첨가하였을 때 세포의 성장에는 유의적인 영향을 확인할 수 없었으나, (+)-eudesmin의 생산성에는 영향을 준 것으로 보였다. Chitosan을 처리하지 않은 대조구에 비해 200 mg/L 처리구에서 1.7배의 증가를 나타내었다(Fig. 8).

요 약

목련과 수종인 함박꽃나무의 현탁배양세포로부터 생리 활성을 갖는 리그난화합물인 (+)-eudesmin을 효율적으로 생산하기 위한 연구로써 플라스크배양 단계에서의 다양한 배양조건들 즉, 배지, 초기 당농도, 교반속도, 초기 접종농도, 그리고 elicitation 효과를 확인하고자 하였다. MS배지를 포함한 4종의 배지에서는 물질의 생산성과 생중량 모두에서 MS배지가 적합한 것으로 나타났다. 130 rpm으로 교반되는 항온배양기에서 3% sucrose와 0.5 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에 0.5 mg (DCW)의 농도로 세포를 접종한 실험구에서 8주 후 플라스크 당 3.71 g (DCW)의 생중량을 얻었으며, 지표물질인 (+)-eudesmin의 함량은 5% sucrose와 200 mg/L chitosan 처리구에서 3.2 µg/g (DCW)으로 대조구에 비해 1.7배의 증가를 나타내었다. 이와 같은 연구결과는 생물반응기를 이용한 목련과 수종에서의 유용물질 생산 연구에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감 사

This study was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

REFERENCES

- Rao, S. R. and G. A. Ravishankar (2002), Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances* **20**, 101-153.
- Matsubara, K., K. Shigekazu, T. Yoshioka, T. Morimoto, Y. Fujita, and Y. Yamada (1989), High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production, *J. Chem. Tech. Biotech.* **46**, 61-69.
- Ulbric, B., W. Wiesner, and H. Arens (1985), Large scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In *Secondary metabolism of plant cell culture*, B. Deus-Neumann, W. Barz and E. Reinhard Eds.; Berlin, Springer-Verlag pp. 293-303.
- DiCostmo, F. and G. H. N. Towers (1984), Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. In *Phytochemical adaptations to stress*, B. N. Timmermann, J. C. Steelink and F. A. Loewus, Eds., p97-175, Plenum press, NY.
- Endress, R. (1994), Plant cell biotechnology, p121-242, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Domenberg, H. and D. Knorr D (1995), Strategies for the improvement of secondary metabolites production in plant cell cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 674-684.
- Fujita, M., H. Itokawa, and Y. Sashida (1972), Honokiol, a new phenolic compound isolated from the bark of *Magnolia ovata*, *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 183-217.
- Kimura, M., J. Suzuki, M. Yamada, M. Yoshizaki, T. Kikuchi, S. Kadota, and S. Masuda (1985), Antiinflammatory effect of neolignans isolated from the crude drug "Shin-i"(Flos Magnoliae), *Planta Med.* **51**, 291-293.
- Kvasnickova, L., Z. Glatz, H. Sterbova, V. Kahle, J. Slanina, and P. Musil (2001), Application of capillary electrochromatography using macroporous polyacrylamide columns for the analysis of lignanas from seeds of *Schisandra chinensis*, *J. Chromatogr. A* **916**, 265-271.
- Sladkovsky, R., P. Solich, and L. Opletal (2001), Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and (E)-cinamic acid in vegetative organs of *Schisandra chinensis* by HPLC, *J. Pharm. Biochem. Anal.* **24**, 1049-1054.
- Paska, C., G. Innocenti, M. Kunvari, M. Laszlo, and M. Szilagyi (1999), Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures, *Phytochemistry* **52**, 879-883.
- Smolny, T., H. Wichers, S. Kalenberg, A. Shahsavari, M. Petersen, and A. W. Alfermann (1998), Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*, *Phytochemistry* **48**, 975-979.
- Seidel, V., J. Windhovel, G. Eaton, A. W. Alfermann, R. R. J. Arroo, M. Medarde, M. Petersen, and J. G. Woolley (2002), Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures, *Planta* **215**, 1031-1039.
- Van Uden, W., N. Pras, and T. M. Malingre (1990), On the improvement of the podophyllotoxin production by phenylpropanoid precursor feeding to cell cultures of *Podophyllum hexandrum*, *Plant Cell Tissue Org. Cult.* **23**, 217-224.
- Petersen, M. and A. W. Alfermann (2001), The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures, *App. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 135-142.
- Park, H. J. (1996), A new aporphine-type alkaloid from the leaves of *Magnolia sieboldii*, *Korean J. Pharmacogn.* **27**, 123-128.
- Choi, J. H., J. Ha, J. H. Park, J. Y. Lee, Y. S. Lee, H. J. Park, J. W. Choi, K. Mass Nakaya, and K.T Lee (2002), Costunolide triggers apoptosis in human leukemia U937 by depleting intracellular thiols. *Japan J. Cancer Res.* **93**, 1327-1333.
- Lim, S. S., K. H. Shin, H. S. Ban, Y. P. Kim, S. H. Jung, Y. J. Kim, and K. Okuchi (2002), Effect of the essential oil from the flowers of *Magnolia sieboldii* on the lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 by rat peritoneal macrophage, *Plant Med.* **68**, 459-462.
- Park, S. H., S. U. Choi, C. O. Lee, S. E. Yoo, S. K. Yoon, Y. K. Kim, and S. Y. Ryu (2001), Costunolide, a sesquiterpene from the stem bark of *Magnolia sieboldii*, inhibits the RAS-farnesyl-proteintransferase, *Plant Med.* **67**, 358-359.
- Murashige, T. and F. Skoog (1969), A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Schenk, R. V. and A. C. Hildbrandt (1972), Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can J. Bot.* **50**, 199-204.
- Lloyd, G. B. and B. H. McCown (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.
- Gamberg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima (1968), Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res.* **50**, 148-151.
- Chang, J. H. and H. J. Lee (1992), Characteristics of oil production during suspension culture with chitosan elicitation, *Ann Res Center for New Bio-Master Agric.* 111-117.
- Miyauchi, T. and S. Ozawa (1998), Formation of (+)-eudesmin in *Magnolia kobus*, *Phytochemistry* **47**, 665-670.
- Stuart, R. and H. E. Street (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.
- Sakato, K. and M. Misawa (1974), Effects of chemical and physical conditions on growth of *Campotheca acuminata* cell cultures, *Agric. Biol. Chem.* **38**, 491-498.
- Mori, T., M. Sakurai, and S. Furusaki (1994), Effects of conditioning factor on anthocyanin production in strawberry suspension cultures, *J. Sci. Food Agric.* **66**, 381-388.
- Sakurai, M. and T. Mori (1996), Stimulation of anthocyanin synthesis

- by conditioned medium produced by strawberry suspension cultures, *J. Plant Physiol.* **149**, 599-604.
30. Do, C. B. and F. Cormier (1999), Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape cell suspension culture, *Plant Cell Rep.* **9**, 143-146.
 31. Misawa, M. (1985), Production of useful plant metabolites. In *Adv Biochem Eng Biotechnol.* A. Fiechter Eds., pp. 59-88, Berlin, Springer-Verlag
 32. Knobloch, K. H. and J. Berlin (1980), Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Z. Naturforsch* **35**, 551-556.
 33. Berlin, J. E. Forche, V. Wray, J. Hammer, and W. Hosel (1983), Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*, *Z. Naturforsch* **38**, 346-352.
 34. Sakamoto, K., K. Iida, K. Sawamura, K. Hajiro, Y. Asada, T. Yoshikawa, and T. Furuya (1993), Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*, *Phytochemicals* **33**, 357-360.
 35. Van Gulik, W. M., A. M. Nuutila, K. L. Vinke, H. J. G. ten Hoopen, and J. J. Heijnen (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.
 36. Zhong, J. J. and T. Yoshida (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.
 37. Su, W. W. and F. Lei (1993), Rosmarinic acid production in perfused *Anchusa officinalis* cultures: Effects of inoculum size, *Biotechnol. Lett.* **15**, 1035-1038.
 38. Zhong, J. J., J. Seki, S. Kinoshita, and T. Yoshida (1992), Physiological characteristics of cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens*, *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1256-1262.
 39. Wu, S., Y. Zu, and M. Wu (2003), High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*, *J. Biotechnol.* **106**, 33-43.
 40. James, P. K., M. D. Samija, G. M. Hewitt, E. C. Bugante, and H. Gu (1993), Antiinflammatoryoleanane triterpenes from *Terygium wilfordii* cell suspension cultures by fungal elicitation, *Plant Cell Rep.* **12**, 356-359.
 41. Gregorio, G. H. and V. M. Loyola-vargas (1997), Effects of ASA on secondary metabolism of *C. roseus* tumor suspension culture, *Plant Cell Rep.* **16**, 87-290.
 42. Funk, C. and P. Brodelius (1990), Influence of growth regulators and an elicitor on phenylpropanoide metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*, *Phytochemistry* **29**, 845-848.