

쑥갓세포의 현탁배양에 의한 β -sitosterol 생산

김현철 · 정하영 · 이소연 · 정호용 · 김유정 · 백남인 · 김성훈
최근원¹ · 김대근² · 권병목³ · 박미현⁴ · 정인식*

경희대학교 생명공학원 및 식물연구센터, ¹경희대학교 원예학과,
²우석대학교 약학과, ³생명공학연구원, ⁴(주)이롬라이프

Production of β -sitosterol by Cell Suspension Culture of *Chrysanthemum coronarium* L.

Hyun Chul Kim, Ha Young Chung, So Youn Lee, Ho Yong Chung, You Jung Kim,
Nam In Baek, Soung Hoon Kim, Geun Won Choi¹, Dae Keun Kim²,
Byoung Mok Kwon³, Mi Hyun Park⁴ and In Sik Chung

Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

¹Department of Horticulture, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

²Department of Pharmacy, Woo Suk University, Jeonju 565-701, Korea

³Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Deajon 305-333, Korea

⁴Erom Life Co. Ltd., Seoul 135-825, Korea

Received September 27, 2005; Accepted October 27, 2005

β -sitosterol is a plant sterol that reduces cholesterol levels and inhibits the growth of human prostate and colon cancer cells. Optimal conditions for β -sitosterol production were examined from cell suspension cultures of *Chrysanthemum coronarium* L. The callus induction was optimal in MS medium containing 1 mg/l NAA and 1 mg/l BAP. Cell suspension culture was also established from the callus. Optimal β -sitosterol production was obtained when the cells were cultured at an initial density of 2 mg DCW/l in MS medium containing 1 X sucrose (30 mg/l), 1 X nitrogen (1900 mg/l KNO₃, 1650 mg/l NH₄NO₃), and 1 X phosphate source (170 mg/l). In cell suspension cultures of *C. coronarium* L. using shake flasks, the peak content of β -sitosterol was 150 μ g/g DCW. In cell suspension cultures of *C. coronarium* L. using an air-lift bioreactor, the maximum β -sitosterol content of 143.8 μ g/g DCW was obtained at an air-flow rate of 100 cc/min.

Key words: β -sitosterol, callus, suspension culture, air-lift bioreactor

서 론

식물로부터 얻어 지는 유용물질의 수요는 계속 증가하고 있지만 식물 자원은 감소하고 있는 추세이다. 이들 대부분의 유용물질이 아직까지 화학적으로 합성하기에는 부적절한 물질이어서 식물 세포배양 기술을 이용한 유용물질의 생산은 최근 많은 관심을 끌고 있다.

유용물질은 재배식물을 통해 생산할 경우 계절, 기상조건, 병충해 등의 제약요인으로 공급이 불안정하다. 그러나 세포배양에 의한 유용물질의 생산은 환경요인의 영향을 받지 않고 생산기간을 단축시킬 수 있으며 배양조건을 최적화해서 생산성을 향상시킬 수 있다¹⁾.

지난 10년간 한국 성인의 사망 통계를 보면 뇌혈관 및 심장 관련 혈관계질환이 중요한 원인이 되고 있다. 혈관계질환은 혈청 내 콜레스테롤이 필요 이상으로 많아 혈관이 막히면서 혈액순환의 장애로 연결되어 생기는 질환이다. 식물유래 β -sitosterol은 낮은 수화도로 인해 소장에서 침전되면서 콜레스테롤의 침전을 유발 시키거나 높은 지용성 때문에 소장에서 담즙 마이셀에 용해되어 있는 콜레스테롤을 치환함으로써 콜레스테롤의 흡수를 저해한다는 것으로 보고되고 있다²⁾. 아울러 식물성 β -sitosterol은 항암, 전립선, 대장 및 항산화 효과가 있으며 안정성과 효용성이 최근 미국 및 유럽 등에서 입증 된 바가 있다³⁾.

쑥갓(*Chrysanthemum coronarium* L.)에 관련하여 개분화에 대한 연구보고⁴⁻⁵⁾와 antioxidants⁶⁾, chrysancorin⁷⁾, dihydrochrysanolide⁸⁾, essential oils⁹⁾, eudesmanolide¹⁰⁾, guaianolide¹¹⁾, pyrethrosin¹²⁾, sesquiterpene lactone¹³⁾, sterol¹⁴⁾, terpenoid¹⁵⁾ 등의 활성물질에 대한 분리 및 동정에 대한 연구보고는 있지만 쑥갓 callus나 세포주로부터 β -sitosterol에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다.

*Corresponding author

Phone: 82-31-201-2436; Fax: 82-31-202-9885

E-mail: ischung@khu.ac.kr

본 연구에서는 쑥갓 세포 배양에 의한 유용 물질인 β -sitosterol의 합성을 위해 callus 유기 및 현탁배양의 여러 요인을 조사하고 적합한 배지조성과 생물반응기의 적용 등을 검토하여 β -sitosterol의 생산성을 극대화 하고자 하였다.

재료 및 방법

Callus 유기 및 현탁세포주의 확립. 본 실험에서 사용된 쑥갓의 callus는 ‘중엽쑥갓’의 잎으로부터 leaf disk 방법으로 유기하였다. ‘중엽쑥갓’의 잎을 2% sodium hypochlorite 용액에서 20분간 표면 살균을 한 후 멸균된 증류수로 3회 세척하였다. 표면 살균된 잎은 지름 10 mm, 두께 2~3 mm의 크기로 잘라서 30 mg/l sucrose, 8 mg/l agar를 첨가한 MS 기본 배지¹⁶⁾ 위에 치상하여 27°C에서 배양하였다. 그리고 호르몬으로 α -naphthalene acetic acid(NAA)와 6-benzylaminopurine(BAP)의 농도를 각각 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg/l로 조건을 달리하여 25가지 배지 조성에서 callus를 유기하였다³⁾.

또한 callus 유기 배지에서 agar만을 제외한 액체 배지 50 ml에 callus를 잘게 부수어 200 ml의 flask를 이용하여 25°C에서 16 h(명)/8 h(암) 시간의 광주기로 현탁 배양하였다. 현탁세포주는 3일의 적응 기간을 거쳐 2주 간격으로 계대배양을 하여 확립하였다. 배지의 pH는 멸균 전 5.7로 조정하였다⁴⁾.

최적 초기세포농도의 영향 실험. 상기 한 바와 같이 확립된 현탁 세포를 이용하여 실험을 수행하였으며 배지는 기본 MS 배지에 NAA 1 mg/l와 BAP 1 mg/l를 첨가한 배지를 이용하였다. 그리고 200 ml의 shake flask에서 50 ml 부피로 16 h(명)/8 h

(암)의 광주조건과 200 rpm의 교반조건으로 배양하였으며 간헐적으로 세포농도를 측정하였다²⁾.

배양 배지조성의 영향 실험. Sucrose는 기본 배지조성에 0.25 배(7.5 mg/l), 0.5배(15 mg/l), 1배(30 mg/l), 2배(60 mg/l)로 함량을 변화시키면서 실험하였고 질소원으로 KNO₃ mg/l와 NH₄NO₃ mg/l을 0배(0 mg/l, 0 mg/l), 0.25배(475 mg/l, 412.5 mg/l), 0.5배(950 mg/l, 825 mg/l), 1배(1,900 mg/l, 1,650 mg/l), 2배(3,800 mg/l, 3,300 mg/l)로 변화 시키면서 그리고 무기인산원으로 KH₂PO₄를 0배(0 mg/l), 0.25배(42.5 mg/l), 0.5배(85 mg/l), 1배(170 mg/l), 2배(340 mg/l)로 함량을 변화시켜 첨가하여 그 영향을 조사하였다. 현탁 배양은 200 ml의 shake flask에 50 ml의 부피로 200 rpm으로 교반하면서 16일간 실험하였다. 그리고 각각의 시료에 대한 세포생육도와 β -sitosterol의 함량을 측정하였다.

생물반응기 실험. 생물반응기로서 air-lift bioreactor(Fig. 1)를 사용하였으며 자세한 규격은 Chung 등¹⁷⁾이 보고한 문헌에 기술되어 있다. 생물반응기의 조업시 배지에 Pluronic F-68(1%) (Sigma, USA)와 antifoam emulsion A(0.3%)(Fluka, Switzerland)를 첨가하였으며 통기량은 20 cc/ml, 50 cc/ml, 100 cc/ml 등으로 변화시키면서 16일 동안 배양하였다. 그리고 세포의 생육도와 β -sitosterol의 함량을 측정하였다.

세포생육도의 측정 및 β -sitosterol 분석방법. 세포의 생육도를 조사하기 위해 dry cell weight(DCW) 측정방법을 사용하였

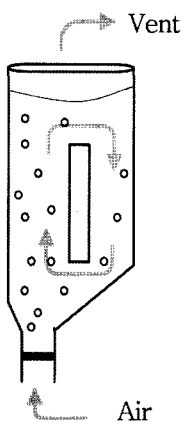
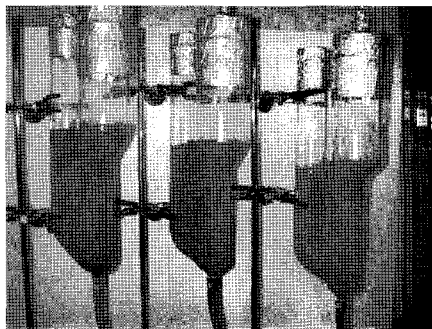
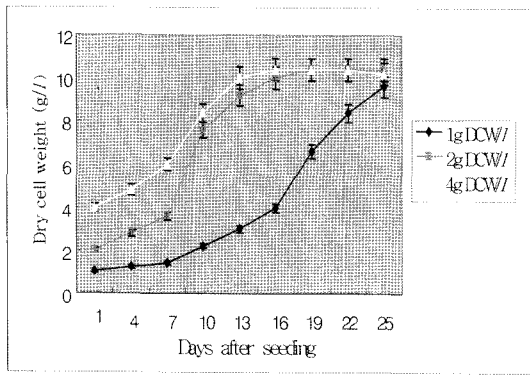


Fig. 1. Schematic diagram of air-lift bioreactor.

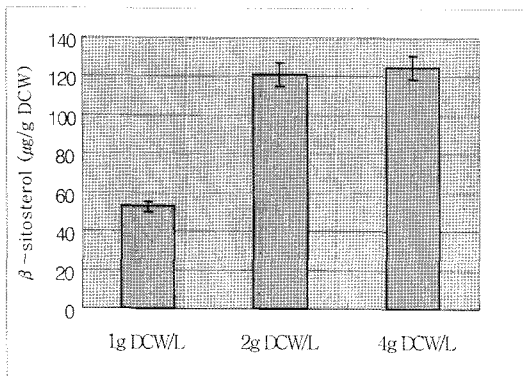
Table 1. Callus induction from *Chrysanthemum coronarium* L.

Plant growth regulator (mg/l)	Callus induction	
	Formation rate (%)	Efficiency*
NAA 0.1+BAP 0.1	19	+
NAA 0.1+BAP 0.5	54	++
NAA 0.1+BAP 1.0	81	++
NAA 0.1+BAP 2.5	73	++
NAA 0.1+BAP 5.0	60	++
NAA 0.5+BAP 0.1	33	+
NAA 0.5+BAP 0.5	74	++
NAA 0.5+BAP 1.0	57	++
NAA 0.5+BAP 2.5	49	+
NAA 0.5+BAP 5.0	40	+
NAA 1.0+BAP 0.1	45	+
NAA 1.0+BAP 0.5	95	+++
NAA 1.0+BAP 1.0	99	+++
NAA 1.0+BAP 2.5	81	++
NAA 1.0+BAP 5.0	79	++
NAA 2.5+BAP 0.1	46	+
NAA 2.5+BAP 0.5	50	++
NAA 2.5+BAP 1.0	70	++
NAA 2.5+BAP 2.5	71	++
NAA 2.5+BAP 5.0	69	++
NAA 5.0+BAP 0.1	46	+
NAA 5.0+BAP 0.5	81	++
NAA 5.0+BAP 1.0	81	++
NAA 5.0+BAP 2.5	91	+++
NAA 5.0+BAP 5.0	93	+++

*Efficiency +: 0-49%, ++: 50-89%, +++: >=90%



(A)



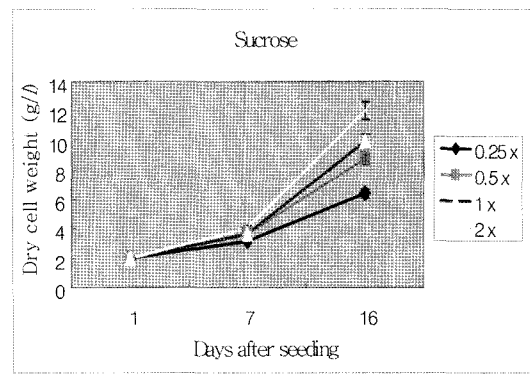
(B)

Fig. 2. Effect of seeding density on cell growth and β -sitosterol production in a suspension culture of *C. coronarium* L. (A) Cell growth from a suspension culture of *C. coronarium* L. (B) β -sitosterol production from a suspension culture of *C. coronarium* L. Results represent the average of triplicate runs. Bar indicates standard deviation.

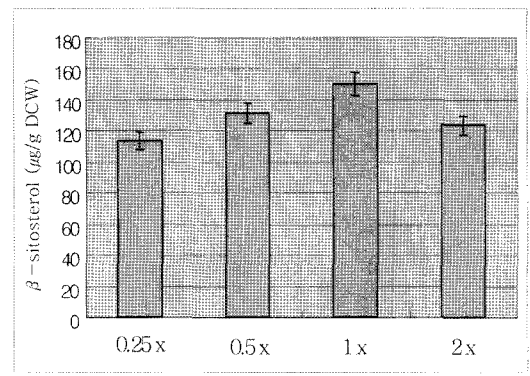
다. 세포 건조중량(DCW)은 5 ml의 세포 배양액을 3000 rpm 에서 15분 동안 원심분리 한 후 증류수로 2번 세척 한 후 80°C 에서 24시간 동안 건조시킨 후 결정하였다. β -sitosterol의 함량은 gas chromatography(Shimadzu GC-14B, Japan)를 이용하여 측정하였다. Column은 silica capillary column(J&W Scientific DB-5: 0.32 mm i.d. 30 m, USA) detector는 FID를 이용하였고 오븐 초기온도는 250°C에서 5분간 유지한 후에 10°C/min씩 상승시켜 최종 온도 320°C에서 15분간 유지 시켰으며, injector와 detector 온도는 350°C로 유지하였다. 분석 시료는 현탁세포를 포함한 배양액을 80% methanol에서 추출한 후 감압농축하여 10 ml의 ethyl acetate에 녹여낸 후 동량의 물을 섞어 분획하였다. 이 과정을 1번 더 반복한 후 분리된 ethyl acetate 층은 다시 감압농축하여 200 μ l의 Bis(trimethylsilyl)acetamide (Lancaster, England)를 이용하여 45°C에서 1시간 정도 trimethylsilylation 한 후에 분석하였다. β -sitosterol의 함량은 β -sitosterol standard (Sigma, USA)와 비교하여 결정하였다.

결과 및 고찰

Callus 유기, 현탁배양 세포주의 확립 및 초기세포농도의 영향. 쑥갓의 잎으로부터 재료 및 방법에 기술한 바와 같은 조건에서 callus를 유기하였다. 쑥갓 callus는 기본 MS배지에 auxin



(A)

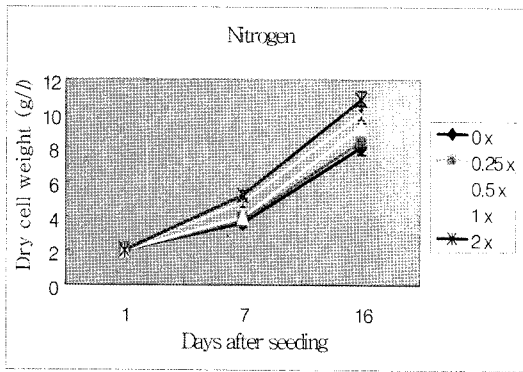


(B)

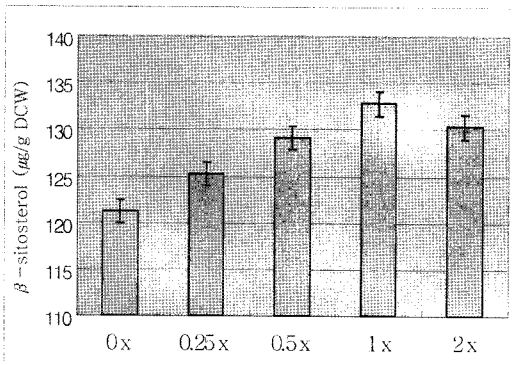
Fig. 3. Effect of sucrose content on cell growth and β -sitosterol formation in a suspension culture of *C. coronarium* L. (A) Cell growth from a suspension culture of *C. coronarium* L. (B) β -sitosterol production from a suspension culture of *C. coronarium* L. Results represent the average of triplicate runs. Bar indicates standard deviation.

계열 호르몬인 NAA와 cytokinin 계열의 호르몬인 BAP를 농도 별로 달리하여 2 주 간격으로 계대배양한 결과 NAA 1 mg/l과 BAP 1 mg/l을 첨가한 조건일 때가 효율이 가장 좋은 것으로 나타났다(Table 1). Lee 등(1997)의 보고에 의하면 쑥갓의 절편 으로부터 신초유기에 NAA와 BAP 농도가 각각 2.5 μ M인 경우 최적이었다. 그리고 Chae 등(2004)의 보고에 의하면 쑥갓의 자엽, 배축, 분엽을 대상으로 하는 신초유기에 NAA와 BAP 농도가 각각 1 μ M인 경우 최적이었다. 본 실험에서 도출된 callus 유기의 최적조건은 상기한 바와 같이 재분화와 관련한 신초유기의 최적조건과는 다른 것을 알 수 있다.

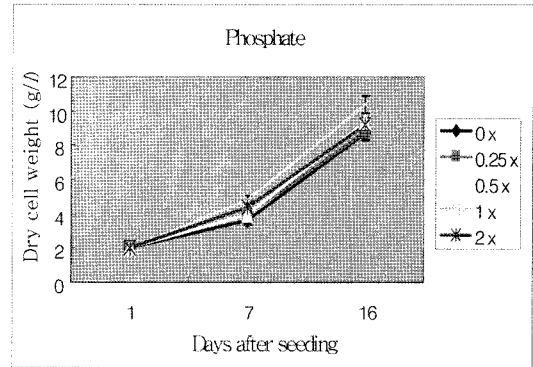
쑥갓 현탁배양 세포주는 액체배지에 callus를 잘게 부수어 2 주 간격으로 계대배양하면서 확립하였으며 3번째 계대배양한 후 실제 실험에 착수하였다. 현탁배양에서 초기세포농도의 영향을 조사하기 위해 초기세포농도를 1g, 2g, 4g DCW//으로 변화시키면서 실험해본 결과 세포성장은 2g DCW//와 4g DCW//에서 다른 초기 세포농도의 경우보다 높게 나타났다. 그림 2에서 알 수 있듯이 특히 배양 21일째까지는 세포농도가 크게 차이를 나타냈다. 또한 초기 농도변화에 따른 β -sitosterol의 생성량을 측정하기 위해 25일째의 세포배양액을 분석해 본 결과 β -sitosterol량은 초기농도 1g, 2g, 4g DCW//에 대해 각각 52.9 $\mu\text{g/g DCW}$, 121.4 $\mu\text{g/g DCW}$, 125 $\mu\text{g/g DCW}$ 로 나타났다(Fig. 2). 이 결과에서 알 수 있듯이 2g DCW//와 4g



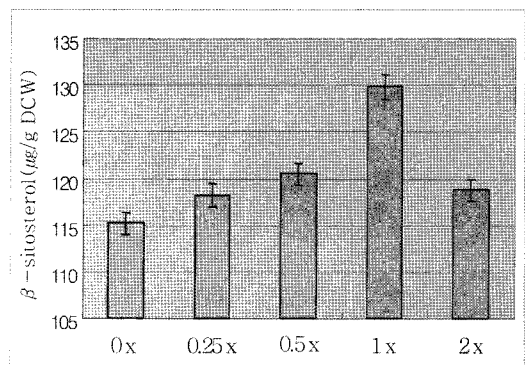
(A)



(B)



(A)



(B)

Fig. 4. Effect of nitrogen content on cell growth and β -sitosterol formation in a suspension culture of *C. coronarium* L. (A) Cell growth in a suspension culture of *C. coronarium* L. (B) β -sitosterol production from a suspension culture of *C. coronarium* L. Results represent the average of triplicate runs. Bar indicates standard deviation.

Fig. 5. Effect of phosphate content on cell growth and β -sitosterol formation in a suspension culture of *C. coronarium* L. (A) Cell growth in a suspension culture of *C. coronarium* L. (B) β -sitosterol production from a suspension culture of *C. coronarium* L. Results represent the average of triplicate runs. Bar indicates standard deviation.

DCW//의 경우에 25일째 세포농도와 β -sitosterol 생성량이 비슷하게 나타났기 때문에 이 후 실험에서는 초기 세포농도를 2g DCW//으로 하여 실험을 수행하였다.

현탁배양에서 배지조성의 영향. 썩갓 현탁배양시 배지에 함유된 탄소원 중 sucrose에 대해서 세포성장과 β -sitosterol 생성에 미치는 영향을 조사하였다. Sucrose는 MS배지의 기본 농도(30 mg/l)에서 2배(60 mg/l)인 경우가 세포성장이 12 g DCW//로 가장 좋은 결과를 나타냈다(Fig. 3). 또한 β -sitosterol 생성량은 배양 16일째 측정할 때 sucrose의 함유량이 기본배지의 0.25배, 0.5배, 1배, 2배인 경우에 각각 113.9 μ g/g DCW, 131.2 μ g/g DCW, 150 μ g/g DCW, 123.9 μ g/g DCW이었다. 이 결과에서 보듯이 β -sitosterol의 함량은 세포성장 결과와 다르게 sucrose가 기본 함량의 1배인 경우 가장 높게 나타났다(Fig. 3).

Sucrose와 마찬가지로 썩갓 현탁배양시에 배지에 함유된 질소원에 대해서 세포성장과 β -sitosterol 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 질소원은 KNO_3 와 NH_4NO_3 로서 MS배지의 기본 농도(1900 mg/l, 1650 mg/l)를 사용한 경우가 세포성장이 10.8 g DCW//로 가장 좋은 결과를 나타냈다(Fig. 4). 또한 β -sitosterol 함량은 배양 16일째 측정할 때 질소원의 함유량이 기본배지의 0배, 0.25배, 0.5배, 1배, 2배인 경우에 각각 121.3 μ g/g DCW, 125.2 μ g/g DCW, 129 μ g/g DCW, 132.8 μ g/g DCW, 130.3 μ g/g DCW 으로 나타났다. 이 결과에서 보듯이 β -sitosterol의 함

량은 질소원이 기본 함량의 1배인 경우에 가장 높았다(Fig. 4).

탄소원, 질소원과 마찬가지로 썩갓 현탁배양 시에 배지에 함유된 무기인산원에 대해서 세포성장과 β -sitosterol 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 무기인산원은 KH_2PO_4 로서 MS배지의 기본 농도(170 mg/l)의 1배인 경우가 세포성장이 10.4 g DCW//로 가장 좋은 결과를 나타냈다(Fig. 5). 또한 β -sitosterol 함량은 배양 16일째 측정할 때 무기인산 함유량이 기본배지의 0배, 0.25배, 0.5배, 1배, 2배인 경우에 각각 115.2 μ g/g DCW, 118.2 μ g/g DCW, 120.5 μ g/g DCW, 129.8 μ g/g DCW, 118.8 μ g/g DCW으로 나타났다(Fig. 5). 이 결과에서 보듯이 무기인산원은 sucrose와 질소원의 경우와 마찬가지로 MS배지의 기본 함량일 때 β -sitosterol 생성량이 가장 높았다.

생물반응기를 이용한 썩갓세포의 배양. 공기부유식 생물반응기(air-lift bioreactor)의 운영조건을 기본 MS 배지에서 통기량(air flow rate)을 L(20 cc/ml), M(50 cc/ml), H(100 cc/ml)의 3가지로 변화를 주어 확인해 본 결과 H(100 cc/ml)일 때 세포 성장은 10.4 g DCW//로 가장 높게 나타났다(Fig. 6). 그리고 β -sitosterol 함량도 gas chromatography로 분석한 결과 통기량이 100 cc/ml 일때 142.8 μ g/g DCW로 가장 높게 나타났다(Fig. 6). 본 연구실에서 제작된 이 생물 반응기는 통기량을 100 cc/ml 이상으로 높이는 어렵게 되어 있어 더 높은 통기량에서 실험을 수행하지는 못했다. 그래서 생물 반응기 통기량이 100

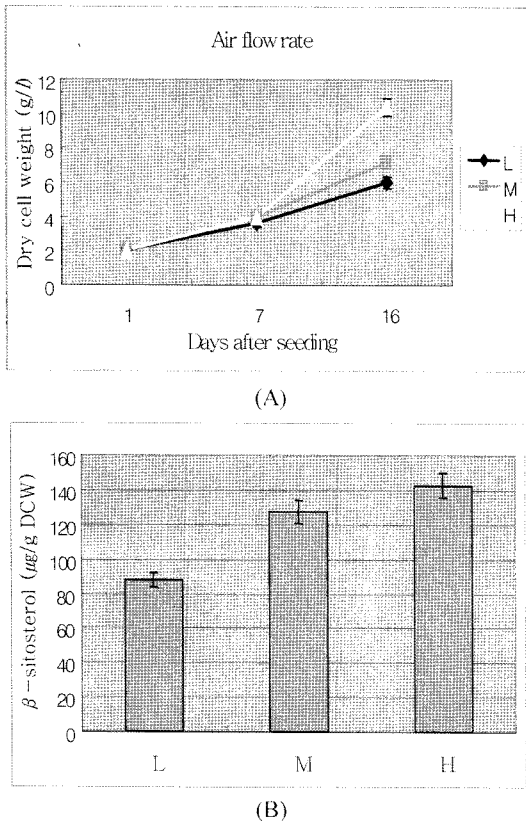


Fig. 6. Effect of an air-lift rate on cell growth and β -sitosterol formation in an air-lift bioreactor. Air lift rate: L, 20 cc/ml; M, 50 cc/ml; H, 100 cc/ml. (A) Cell growth in a bioreactor culture of *C. coronarium* L. (B) β -sitosterol production from a bioreactor culture of *C. coronarium* L. Results represent the average of triplicate runs. Bar indicates standard deviation.

cc/ml에서 최적 배지조건을 이용해서 shake-flask와 병행하여 비교실험을 수행하였다. 이 결과 생물반응기에서 세포 성장과 β -sitosterol의 생산은 동시에 수행한 shake flask에서의 결과에 비해 약간 높기는 하지만 거의 비슷한 수준이었다. 식물세포배양에 의한 유용물질 생산에 관한 논문에서 생물반응기의 경우 shake-flask의 결과보다 종종 저조한 수율을 보여주었는데¹⁸⁾ 이러한 보고와 비교하면 본 실험결과는 우수한 것이며 생물반응기에서 쑥갓세포 배양에 의한 β -sitosterol 생산의 성공 가능성을 간접적으로 나타낸다.

본 연구에서는 쑥갓으로부터 callus의 유기, 현탁세포의 확립, 배양조건 최적화 및 β -sitosterol 생산에 대한 실험을 수행하였다. 쑥갓 세포배양에 의한 β -sitosterol 생산연구는 이 논문이 처음인 것으로 사료된다. β -sitosterol 생산의 최적화에 대한 추가적인 실험이 필요하겠지만 본 연구 결과는 쑥갓에서 활성물질 β -sitosterol의 생산에 세포의 현탁배양이 보다 유용하게 이용될 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

초 록

β -sitosterol은 식물 스테롤로서 인간의 전립선암과 대장암 세포의 성장을 억제하고 생체내 콜레스테롤 농도를 감소시킨다. 본 연구에서는 쑥갓세포 배양에서 β -sitosterol 생산의 최적화 연

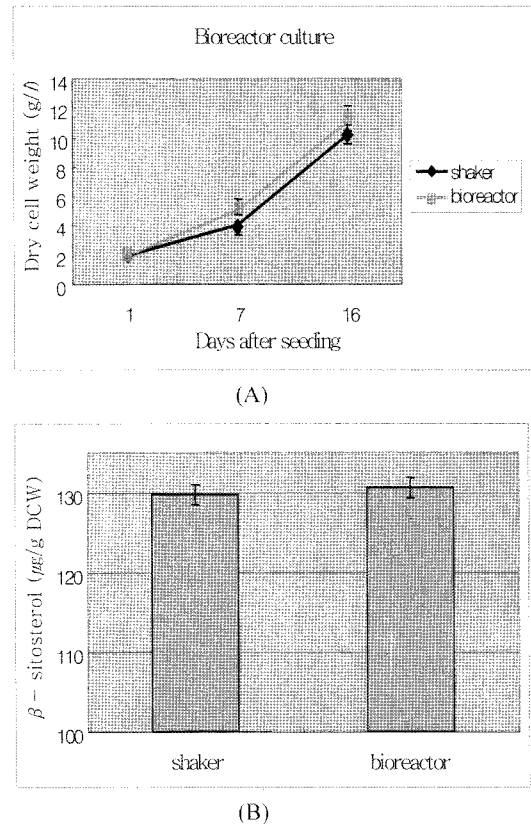


Fig. 7. Comparison of shake-flask and bioreactor culture of *C. coronarium* L. (A) Cell growth. (B) β -sitosterol production. Results represent the average of triplicate runs. Bar indicates standard deviation.

구를 수행하였다. 그래서 쑥갓(*Chrysanthemum coronarium* L.) 으로부터 캘러스 유도는 NAA와 BAP의 농도가 각각 1 mg/l의 조합에서 최적이었으며 이들 캘러스로부터 현탁배양 세포주를 확립하였다. 현탁 배양시 초기 세포농도 2 g DCW/l에서 조성이 각각 1배인 탄소원(30 mg/l), 질소원(1900 mg/l KNO₃, 1650 mg/l NH₄NO₃), 무기인산원(170 mg/l)을 포함하는 MS 배지에서 β -sitosterol 생산이 최적으로 나타났다. Shake-flask를 이용한 현탁배양에서 β -sitosterol의 최대 생산량은 150 $\mu\text{g/g DCW}$ 이었다. 그리고 공기부유식 생물반응기의 배양에서는 100 cc/ml의 통기량에서 β -sitosterol의 생산이 142.8 $\mu\text{g/g DCW}$ 으로 나타났다.

Key words: β -sitosterol, 캘러스, 현탁세포주, 공기 부유식 생물 반응기

감사의 글

본 연구는 경희대학교 식물대사연구센터와 농촌진흥청 바이오그린 21사업에서 지원하는 연구비로 수행하였음.

참고문헌

1. Zhong, J. J. (2001) Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **72**, 1-26.

2. Jong, A. D., Plat, J. and Mensink, R. P. (2003) Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J. Nutr. Biochem.* **14**, 362-369.
3. Bouic, P. J. (2001) The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr. Opin. Clin. Nutr.* **4**, 471-475.
4. Lee, T., Huang, M. E. E. and Pua, E. C. (1997) High frequency shoot regeneration from leaf disc explants of garland *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum coronarium* L.) *in vitro*. *Plant Sci.* **126**, 219-226.
5. Chae, W. B., Choi, G. W., and Chung I. S. (2004) Plant regeneration depending on explant type in *Chrysanthemum coronarium* L. *J. Plant Biotechnol.* **6**, 253-258.
6. Takenaka, M., Nagata, T. and Yoshida, M. (2000) Stability and bioavailability of antioxidants in garland (*Chrysanthemum coronarium* L.) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2689-2691.
7. Wang, H., Ye, X. Y. and Ng, T. B. (2001) Purification of chrysancorin, a novel antifungal protein with mitogenic activity from garland chrysanthemum seeds. *Biol. Chem.* **382**, 947-951.
8. Lee, K. D., Yang, M. S., Ha, T. J., Park, K. M. and Park, K. H. (2002) Isolation and identification of dihydrochrysanolide and its 1-epimer from *Chrysanthemum coronarium* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 862-865.
9. Alvarez-Castellanos, P. P., Bioshop, C. D. and Pascual-Villalobos, M. J. (2001) Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry* **57**, 99-102.
10. Lee, K. D., Ha, T. J., Park, K. H. and Yang M. S. (2001) Isolation of eudesmanolides derivatives from the flower of *Chrysanthemum coronarium* L. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **9**, 269-274.
11. Lee, K. D., Park, K. H., Kim, H., Kim, J., Rim, Y. and Yang, M. S. (2003) Cytotoxic activity and structural analogues of guaianolide derivatives from flower of *Chrysanthemum coronarium* L. *Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 29-32.
12. Lee, K. D., Park, K. H., Ha, T. J., Han, H. S. and Yang, M. S. (2003) Isolation of pyrethrosin derivatives from the flower of *Chrysanthemum coronarium* L. *Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 76-79.
13. El-Masry, S., Abou-Dania, A. H. A., Darwish, F. A., Abou-Karum, M. A., Grenz, M. and Bohlamann, F. (1984) Sesquiterpene lactones from *Chrysanthemum coronarium*. *Phytochemistry* **23**, 2593-2594.
14. Song, M. C., Hong, Y. H., Kim, D. H., Kim, D. K., Chung, I. S., Lee, Y. H., Kim, S. H., Park, M. H., Kim, I. H., Kwon B. M. and Baek, N. I. (2003) Development of biologically active compounds from edible plant sources-VI. Isolation of sterol compounds from the aerial parts of garland (*Chrysanthemum coronarium* L.) *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 376-379
15. Lee, K. D., Ha, T. J., Lee, B. W., Lee, J. R., Lee, J., Hwang, S. W., Cho, D. Y., Nam, S. and Yang, M. S. (2003) Isolation and identification of terpenoids from the leaf of *Chrysanthemum coronarium* L. *J. Kor. Soc. Chem. Biotechnol.* **46**, 55-59.
16. Murashige, T. and Skoo, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**, 473-479.
17. Chung, I. S., Kang Y. M., Oh, J. H., Kim, T., Lee, H. J. and Chae, Y. A. (1994) Continuous suspended cell culture of *Mentha piperita* in cell-recycled air-bioreactor. *Biotechnol. Tech.* **11**, 789-792.
18. Bae, G. W., Chung, C. S., Kim, K. I., Park, C. H., Lee, H. J., Chae, Y. A. and Chung, I. S. (1998) Improved indirubin production in a two-phase suspension culture of *Polygonum tinctorium* using dimethylpolysiloxane. *Biotechnol. Tech.* **11**, 843-845.