

형질전환된 황기 모상근으로부터 Astragalosides의 생산을 위한 연구

황 성 진

동신대학교 한약재산업학과

(접수 : 2005. 9. 23., 게재승인 : 2006. 4. 6.)

High-Yield Production of Astragalosides from Transgenic Hairy Root Cultures of *Astragalus membranaceus*

Sung Jin Hwang

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

(Received : 2005. 9. 23., Accepted : 2006. 4. 6.)

A transgenic hairy root clone AG-04 of *Astragalus membranaceus* was obtained following co-cultivation of leaf explants with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. This clone was examined for its growth and production of cyclolanostane-type saponins, astragalosides I, II, and III, under various culture conditions. Among the five basal media tested, Shenk and Hildebrandt (SH)(18) medium was best for roots growth and astragalosides production. The maximum root biomass was obtained at inoculum size of 500 mg FRW per flask, initial sucrose concentration of 3%, and shaking speeds of 90 rpm. The astragalosides production was promoted when the hairy root clone AG-04 was cultured at shaking speeds of 120 rpm and light irradiation of 18 h. Astragaloside contents was also stimulated with high initial sucrose concentration, and the maximum astragalosides contents of 6.21%/g DRW was obtained at initial sucrose concentration of 6%. The addition of chitosan (100 mg/L) to the culture medium was significantly increased astragalosides production. This was 2.1 times higher than that obtained in a control culture without chitosan.

Key Words : *Astragalus membranaceus*, hairy root, astragalosides, inoculum size, light irradiation shaking speeds, sucrose concentration, chitosan

서 론

식물의 상처 부위를 통해 식물세포의 게놈 안으로 삽입된 *Agrobacterium rhizogenes*의 T-DNA에 의해 유도되는 부정근은 성장속도가 다른 부정근에 비해 매우 빠르고 분지화가 급속히 이루어지는 특성을 나타내며 유전적으로나 화학적으로 세대를 통해 안정성을 유지하기 때문에 몇가지 문제점만 해결 된다면 식물 유래 유용물질을 상업적으로 생산하는데 재료로써 폭넓게 활용이 가능하다(1). 식물 유래 천연물질 생산을 위해 탈분화된 세포를 사용할 경우 배가시간에 도달하는 속도가 빠르고, 우량 세포주 (cell lines)의 선발이 비교적 용이하며, 생물변환 (biotransformation)과 같은 대사조절이 용이하다는 잇점들이 있으나, 계대배양 과정에서 체세포변이의 발생율이 기관배양에 비해 매우 높고 이로 인해 화학

적 안정성이 떨어지게 된다는 점과 대부분 유용물질이 이차 대사물질인 점을 고려할 때 미분화된 체세포에서 목적하는 물질의 생합성을 이끌어 내기란 쉽지가 않다는 것이 문제점으로 나타나고 있다(2). 최근 약리물질을 함유하는 식물로부터 형질전환된 부정근 (즉, 모상근)을 유도하고 적절한 배양 조건 하에서 물질의 생산성을 검정하는 다양한 연구들이 진행되어지고 있으며, 플라스크배양 단계로부터 다양한 형태의 생물반응기를 이용한 대량배양 단계로의 scale-up이 시도되고 있다(3-6). 즉, 약리물질을 포함한 식물유래 천연소재의 획득 방식이 환경 의존적인 재배식물보다는 세포배양공학기술을 활용하여 공장화시스템을 통한 년중 대량생산 방식으로 전환되어지고 있다(7).

황기 (*A. membranaceus*)는 전통적으로 감기치료나 부종, 고혈압, 심장질환, 그리고 만성설사 치료 등에 사용되어져 왔으며(8), 최근 약리학적 연구를 통하여 항스트레스 작용, 간질환 치료, 항이노 작용, 진통 및 진정작용을 나타내는 물질이 뿌리에 함유하고 있음이 보고된 바 있다(9). 특히, 뿌리에 함유하는 cyclolanostane-type saponins은 림프구의 증식과 면역증진, 그리고 손상된 간의 회복 등에 중요한 약

† 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 : jinhwang@naver.com

리효과를 나타내는 것으로 알려지고 있다(10-12). 이와 같은 황기 뿌리 함유 생리활성물질들을 산업화하기 위해서는 건물중당 물질의 생산성을 극대화할 수 있는 기술의 확보가 필요하다. 그러나, 황기의 경우 지금까지 세포나 조직의 인공배양을 통해 약리물질을 효율적으로 생산해 내는 세포배양공학기법이 적용되어진 바 없고, 단지 형질 전환된 부정근에서 모식물체와 같은 생리활성물질의 생합성 유무를 확인하는 연구가 일부 이루어졌다(13-15).

본 연구에서는 황기의 뿌리에서 생합성되는 주요 약리물질인 cyclolanostane-type saponins (astragalosides I, II, III)을 생물반응기 시스템을 이용해 대량생산하기 위한 연구의 일환으로 *A. rhizogenes* ATCC15834에 의해 황기의 잎 절편으로부터 형질전환된 부정근 (즉, 모상근)을 유도한 후 일차적으로 플라스크 수준에서의 최적 성장과 약리물질의 생합성 효율을 극대화할 수 있는 다양한 물리화학적 조건들을 조사하였다.

재료 및 방법

형질전환근의 유도 및 clone 선발

황기 (*Astragalus membranaceus*)의 종자는 Elixir Farm Botanicals (USA)로부터 구입하여 70% (v/v) ethanol과 2% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 2-3분 동안 침지시켜 표면살균 한 후 무균수로 3회 세척 후 식물호르몬이 포함되지 않은 Murashige and Skoog (MS)배지(16) (2% sucrose, pH 5.7)에 치상하여 항온실에서 무균적으로 발아를 유도하였다. 발아 유식물은 8주동안 동일한 배지에서 배양한 다음 실험에 사용하였다. 황기의 형질전환은 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834를 감자추출물 배지(17)에서 24시간 배양하여 기내 (*in vitro*)에서 증식된 황기 잎절편과 48시간 공조배양한 다음 무균수로 2-3회 세척후 200 mg/L cefotaxime이 포함된 MS 배지에 치상 하였다. 4주 후 황기의 잎조직 절편으로부터 형성된 길이 1.5 cm의 부정근 만을 절취하여 동일한 조성의 고형배지에서 증식 시켰다. 이러한 증식과정에서 뿌리의 성장 속도와 분지되는 양상에 따라 1차적으로 5종의 clones을 선발하고, 이를 항생제가 제거된 MS 액체배지로 옮겨 6주 배양후 saponins의 함량에 따라 유의성을 보이는 3종의 clones을 최종적으로 선발 하였다.

형질전환근의 배양 (I)

3종의 clones 중 생중량과 물질생합성에서 모두 우수한 AG-04를 모든 실험에 사용 하였다. 형질전환근의 성장과 물질의 생산성에 적합한 기본배지를 선정하기 위하여 MS 배지와 무기염의 농도를 절반으로 낮춘 1/2 MS배지, SH 배지(18), WPM배지(19), 그리고 B₅배지(20)를 사용하였으며, 배지내 초기 sucrose의 농도는 3 (w/v)에서부터 12% (w/v)까지 농도별로 첨가 하였다. 회분배양 (batch culture) 후 건물중 (DRW)과 물질의 생산성에 미치는 적정 초기 접종량을 확인하기 위해서 근단으로부터 1.5 cm 크기의 형질전환근을 약 5, 50, 500, 5000 mg (생중량; FRW) 씩 50

ml 배지가 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 접종하여 배양 (25 ± 1°C) 하였다.

형질전환근의 배양 (II)

배양과정에서 물리화학적 자극에 의한 형질전환근의 성장과 물질 생합성율을 확인하기 위하여 배양 2주후 Chitosan (Sigma, USA)을 Chang 과 Lee (25)의 방법에 따라 준비한 후 농도별 (1, 10, 100, 그리고 1000 mg/L)로 배지에 첨가하였다. 한편, 교반속도에 따른 영향을 조사하기 위해 시료를 Shaking incubator에 넣은 후 60, 90, 120, 그리고 150 rpm으로 각각 조정하여 배양 하였으며, 광조건에 따른 영향은 시료를 암상태와 50 μmol m⁻²s⁻¹로 18시간 조사, 연속조사하는 방식으로 배양 하였다.

성장률의 측정

형질전환근의 성장률은 8주 동안 배양된 조직을 여과지 위에서 24시간 탈수 시킨 뒤 측정된 생중량 (fresh roots weight; FRW)과 냉동건조기 (EYELA, Japan)에서 48시간 건조한 후 측정된 건중량 (dry roots weight; DRW)으로 나타내었다.

Astragalosides의 분석

8주 동안 배양된 형질전환근을 수집한 다음 냉동건조시켜 막자사발에서 분말화하였다. 분말시료 약 0.5 g에 70% (v/v) 메탄올 70 ml을 가하여 수욕상에서 3회 반복하여 물질을 추출하고, 이들을 3,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상정액만을 취하여 정량분석에 사용 하였다. Astragalosides의 정량은 Ionkova 등(21)의 방법에 따라 수행하였다. Silica gel 60 F plate에 capillary tube를 사용하여 시료를 점적한 다음 CHCl₃-MeOH-CH₃CHOCH₃-H₂O (80 : 50 : 10 : 10) 용액이 들어있는 TLC box에서 전개시킨 후 건조시켰다. 이후 TLC plate에 p-dimethylaminobenzaldehyde를 분무하고, 105°C에서 10분간 가온한 다음 TLC scanner (Shimazu, Japan) (483 nm)를 이용하여 정량 하였다. 정량곡선은 astragaloside I, II, III 표품을 메탄올 용액에 녹여 농도별로 점적한 후 동일한 방법으로 전개시키고 TLC scanner를 통해 표준곡선을 마련한 후 비교정량하였다.

결과 및 고찰

Clones 선발

식물로부터 유용물질을 최대로 획득하기 위해서는 일차적으로 우수한 세포주 (cell lines, 또는 clones)의 선발이 이루어져야 한다. *A. rhizogenes* spp.에 의해 형질전환된 모상근으로부터 clones을 선발하는 방식은 탈분화된 세포를 가지고 이루어지는 세포주 선발과는 약간 다르다. 황기의 경우 동일한 균주를 사용하여 잎절편으로부터 부정근을 유도하고, 근단으로 약 1.5 cm 가량을 절취하여 식물호르몬이 첨가되지 않은 1/2 MS 고형배지에서 3주간 배양하면서 성장속도와 분지화 양상에 따라 일차적으로 5개의 clones을 선발하였다. Ionkova 등(21)은 4종의 *A. rhizogenes* strains

을 가지고 형질전환을 유도하였으며, 이들로부터 유도된 모상근을 각각 clones으로 선발한 바 있다. 황기의 모상근 clones들은 MS 액체배지에 접종하여 6주동안 배양한 후 astragalosides의 함량 비교를 통해 3개의 clones (AG-01, AG-04, AG-05)을 재선발 하였다. 3개의 clones 중 성장속도와 물질함량에서 높게 나타난 AG-04를 이후 모든 실험에 사용하였다.

배지 및 초기 당의 농도

형질전환된 모상근의 성장과 물질의 생산성에 적합한 기본배지를 선정하기 위하여 식물호르몬이 첨가되지 않은 5종의 기본배지 즉, MS배지, 1/2 MS배지, SH배지, WPM배지, 그리고 B₅배지에 각각 AG-04 clone을 접종하였다. 6주 후 배지별 성장률은 flask 당 1.25 g (DRW)을 나타낸 SH배지가 다른 4종의 배지보다 높게 나타났다(Fig. 1-A). 일반적으로 고농도의 염을 함유하는 MS나 LS(22)배지가 모상근의 초기 성장에 적합하지 않은 경우가 간혹 있으며, 배지에 첨가하는 당의 농도 또한 배지의 삼투압을 증가시켜 오히려 모상근의 분화를 억제하기도 한다. 황기 모상근의 경우는 6주 배양 후 건조중량에서 무기염의 농도를 절반으로 줄인 1/2 MS배지와 SH배지 간에 약 2.1배의 차이를 보여주었다. Astragalosides의 함량 또한 SH배지에서 가장 높게 나타났다(Fig 1-B). 이와 같이 동일 배지성분이 모상근의 성장과 물질 함량에 있어서 효과를 나타내기도 하지

만 성장과 물질생산에 있어서 각기 다른 배지조건을 필요로 하기도 하는데 이 경우에는 2단계 배양 시스템을 활용하여 성장을 최대로 높인 다음 배지성분을 바꿔 물질합성을 극대화하는 방법이 필요하다.

타가영양적 성장을 하게 되는 배양체들에게는 외부에서 에너지원인 탄소원을 충분하게 제공해 줄 필요가 있다. 배지성분에 포함시켜 공급받게 되는 당은 세포의 구성성분과 에너지원으로 이용되어 세포의 성장을 가져오고 액체 배양에서는 배지의 삼투조절 작용까지 하게 된다. 이러한 이유로 세포배양 과정에서 초기에 적정 농도의 탄소원의 종류와 농도가 반드시 설정되어져야 한다. 황기의 모상근 배양에 있어서는 탄소원으로 sucrose를 사용하였으며, SH배지에 3%에서 12%까지 첨가한 후 6주 동안 배양하였다. 모상근의 성장률은 3% sucrose 처리구에서 flask 당 1.21 g (DRW)이었으며(Fig. 2-A), astragalosides의 생산성의 경우 6% sucrose 처리구에서 건조중량이 가장 높았다(Fig. 2-B). 그러나, 9% 이상 처리구에서는 성장률의 저하와 함께 astragalosides의 함량이 감소하였다. Sakato 등(23)은 *C. acuminata*의 세포배양에서 Mori 등(24)과 Sakurai 등(25)은 딸기 세포배양에서 각각 배지내 sucrose의 처리 농도를 7% 이상 12%까지 고농도로 처리하여 물질 생산성을 극대화시킨 바 있으나, Do 등(26)은 anthocyanin의 생합성을 높이기 위해서는 초기 sucrose의 농도를 5% 이하로 낮추어 주는 게 바람직하다고 한 바 있다. 또한 Zhong(27)은 인삼세

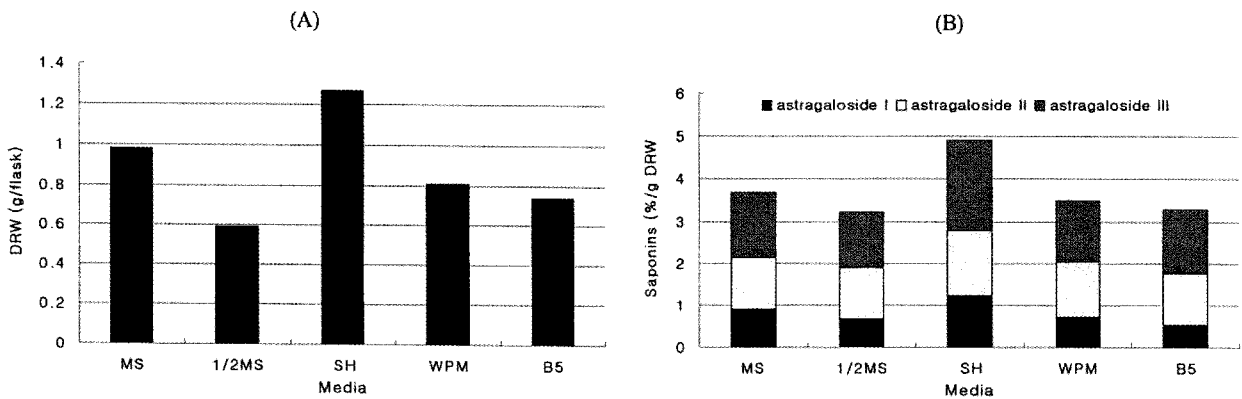


Figure 1. Effects of culture media on biomass (A) and saponins contents (B) in hairy root cultures of *A. membranaceus*.

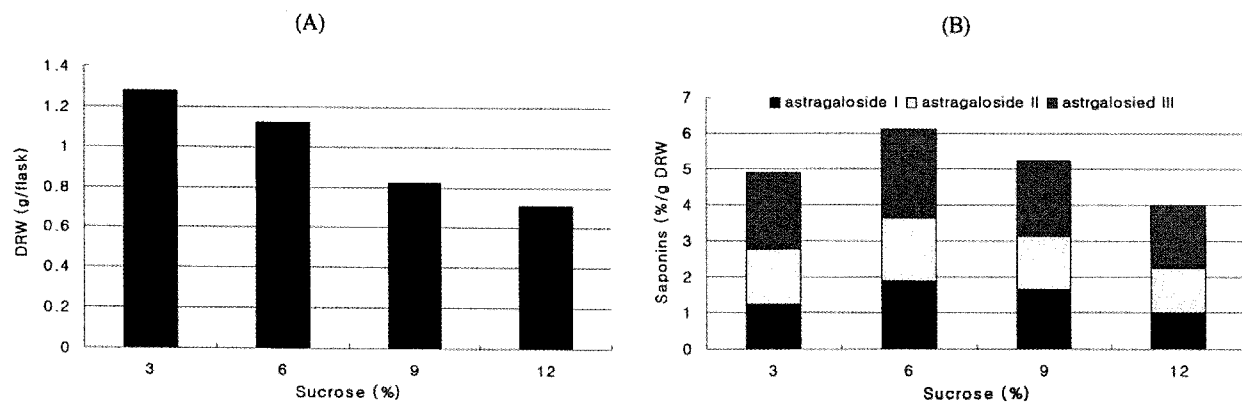


Figure 2. Effects of initial sucrose concentration on biomass (A) and saponins contents (B) in hairy root cultures of *A. membranaceus*.

포의 현탁배양 연구에서 초기 sucrose 농도가 saponins의 생합성에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 보였다. 이와 같은 차이는 배양세포의 대사생리학적 차이나 유전학적 특성에 의한 것으로 사료된다. 한편, 현탁배양세포의 성장 곡선을 지속적으로 유지시키기 위해서는 세포에 의해 사용되어지는 양 만큼 적당량의 당을 주기적으로 공급해 주는 것이 효과적일 수 있다. Wang 등(28)은 *T. chinensis*의 세포배양에서 sucrose를 주기적으로 공급함으로써 taxane의 생산성이 현저하게 증가함을 확인한 바 있다. 그러나, 황기 모상근의 경우 3주 후부터 1주일 간격으로 0.1% 농도로 배지에 첨가해주었으나 초기에 처리한 실험구에 비해 현저한 생산성 증가를 확인할 수 없었다(data not shown).

초기접종 농도

세포현탁배양의 경우 초기 접종 농도가 세포의 성장곡선을 변화시키고 물질의 생합성에까지 영향을 미치게 된다(29, 30). 형질전환된 모상근의 배양의 경우에도 초기 접종 농도는 물론 모상근의 길이와 상태와 같은 요인들에 의해 모상근의 성장과 물질 생산성이 좌우되는 경우가 있다. 근단부위가 포함된 길이 약 1.5 cm의 황기의 모상근을 50 ml 배지가 들어있는 100 ml 용량의 플라스크에 5, 50, 500, 5000 mg (FRW) 씩 각각 접종 한 후 Shaking incubator에서 배양하였을 때 4주까지는 초기 접종농도에 비례해서 외부에서도 쉽게 관찰될 정도로 biomass의 차이를 확인할

수 있었으나, 6주 후 최종적으로 시료를 수거하여 측정된 건조량에서 500 mg (FRW)을 접종한 실험구가 가장 높았다(Fig. 3-A). Kanokwaree 와 Doran (31)은 *A. belladonna*의 모상근을 가지고 한 실험을 통해 초기 접종한 모상근의 수가 증가할수록 성장이 감소한다고 보고한 바 있다. Bhadra 와 Shanks (32)는 *C. roceus*의 모상근 배양에서 모상근의 수나 배지의 양 보다는 모상근의 길이가 성장률을 좌우 한다고 보았다. 이처럼 모상근의 특성이나 선택에 있어서의 차이가 있음에도 불구하고 모상근의 배양에 있어서 초기 농도는 세포현탁배양에서와 같이 성장에 영향을 미치는 것으로 보인다. 한편, astragalosides의 함량에서는 500 mg (FRW)를 접종한 실험구에서 가장 높았고, 그 이상의 농도에서는 4주 후부터 모상근의 밀도 증가에 따른 근단부위의 성장 저해 등으로 인해 생중량과 물질의 생산성이 감소하였다(Fig. 3-B). 한편, 근단부위로부터 1 cm 이하 길이로 시료를 채취할 경우에는 분지화가 늦고 모상근의 성장이 초기에 지연됨으로 인해 회분배양 특성상 최종적으로 생중량의 저하가 나타났으며, 2 cm 이상으로 절취할 경우에도 분지화 정도의 차이를 확인할 수 없었다.

교반속도

세포의 현탁배양에서 교반은 세포의 증식에 따른 침해를 억제하고, 산소 공급을 원활하게 해주기 때문에 세포의 빠른 성장을 위해 반드시 적정 수준이 유지될 필요가 있

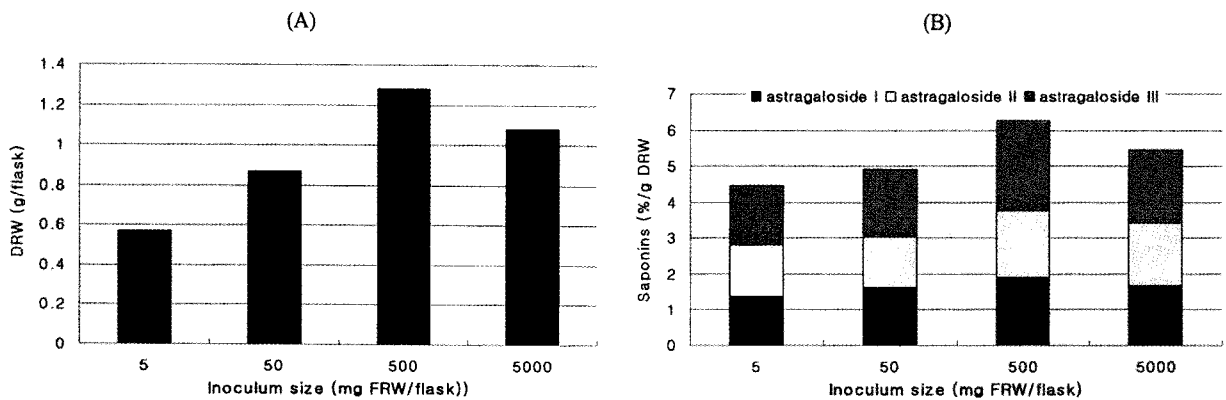


Figure 3. Effects of inoculum size on biomass (A) and saponins contents (B) in hairy root cultures of *A. membranaceus*.

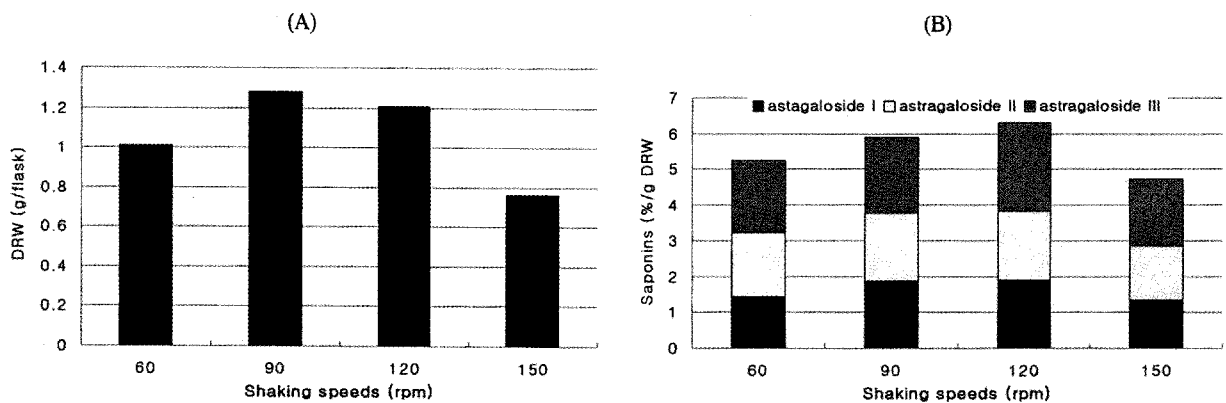


Figure 4. Effects of shaking speeds on biomass (A) and saponins contents (B) in hairy root cultures of *A. membranaceus*.

다. 또한, 유용물질 대부분이 이차대사산물로 물리화학적 자극에 대한 방어작용에 관련되는 것들이 많기 때문에 배양과정에서 교반은 세포에 적당한 수준의 물리적인 자극 (shear effects)을 줌으로써 생합성을 촉진하게 된다(33). 황기의 모상근의 배양에 있어서 적합한 교반속도를 확인하기 위하여 Shaking incubator의 교반속도를 60 rpm에서부터 150 rpm까지 변화 시켰을 때 90 rpm으로 교반할 경우 모상근의 성장이 가장 활발한 것으로 나타났다(Fig. 4-A). 한편, astragalosides의 함량은 90 rpm에서부터 120 rpm까지 점차 속도를 높일수록 생산성 증가를 보여 주었으나, 그 이상의 속도에서는 효과를 기대할 수 없었다(Fig. 4-B). 세포배양의 경우에는 100-120 rpm 범위에서 교반이 이루어지며, 물리적인 자극을 통해 물질생산성을 증가 시킬 목적으로 교반속도를 120 rpm 이상으로 높이는 경우가 있다. Wu 등(34)은 *R. sachalinensis* 세포의 현탁배양 실험에서 최대 건물중량은 교반속도 100 rpm에서 물질의 생산성은 이보다 빠른 속도인 150 rpm에서 얻은 바 있다. 그러나, 황기의 모상근의 경우 과도한 rpm의 높임은 근단부위의 성장을 저해함으로써 오히려 물질의 생산성을 떨어뜨리는 것으로 보였다.

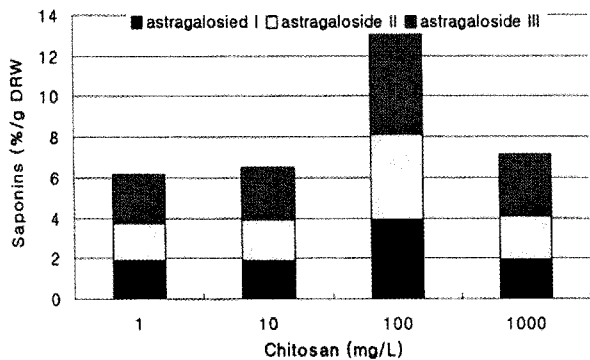


Figure 5. Effects of chitosan on saponins accumulation in hairy root cultures of *A. membranaceus*.

Elicitation

서식지의 환경조건에 따라 변화를 보이는 이차대사물질의 생산성 때문에 기내 (in vitro)에서 세포나 조직의 배양을 통하여 유용물질을 생산하는 과정에서 곰팡이의 세포벽 추출물이나 효모 추출물, MeJA, 또는 chitosan과 같은 외부자극 유도물질을 적절히 활용하고 있다. Chitosan은 β-1,4-glucosamine 중합체로 세포벽의 목질화와 세포대사에 영향을 주어 다른 어떤 elicitors보다도 효과를 기대할 수 있는 물질로 알려지고 있다. Hwang(35)과 Merkli 등(36)은 *R. glutinosa*와 *T. foenumgraecum*의 모상근 배양에서 각각 50 mg/L와 40 mg/L의 chitosan을 처리하여 catalpol과 diosgenin의 생산성을 향상 시킨바 있다. 황기의 모상근배양의 경우 배양 2주 후에 각 실험구별로 chitosan을 1, 10, 100, 그리고 1000 mg/L 씩 최종 농도를 맞추어 배양액에 첨가하였을 때 1000 mg/L 처리구를 제외하고 모든 실험구에서 모상근의 성장에는 크게 영향을 미치지 않은 대신 astragalosides의 생합성에는 영향을 주었다. 즉, 100 mg/L chitosan 처리구에서 대조구에 비해 astragalosides의 생합성

이 2.1배 증가하였다(Fig. 5).

광조사

광조건 하에서 배양된 조직은 녹색을 띄게 되는데 이 경우 엽록체의 대사경로에 관련된 효소반응의 변화로 암조건에서 배양한 조직과는 다른 생합성능을 나타낸다(37). Seitz와 Hinderer(38)는 *D. carota*의 세포배양에서 광을 조사할 경우 anthocyanin의 함량이 증가함을 관찰하였다. 그러나, Tabata 등(39)은 nicotine과 shikonin과 같은 이차대사물질의 생합성이 광조사에 의해 현저히 억제되어짐을 확인한 바 있다. Mulder-Krieger 등(40)은 *M. chamomilla*의 캘러스배양에서 광을 조사할 경우 sesquiterpeneds의 생합성이 변화함을 확인한 바 있다. 황기 모상근의 경우 광을 18시간 조사하였을 때 암배양에 비해 astragalosides의 함량의 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이러한 결과를 놓고볼 때 astragalosides의 생합성은 광조사와 직,간접적으로 관련이 있는 것으로 사료되어지며, 앞으로 시료에 조사되는 광의 특성과 광의 강도에 따른 효과를 확인할 필요가 있다고 사료되었다.

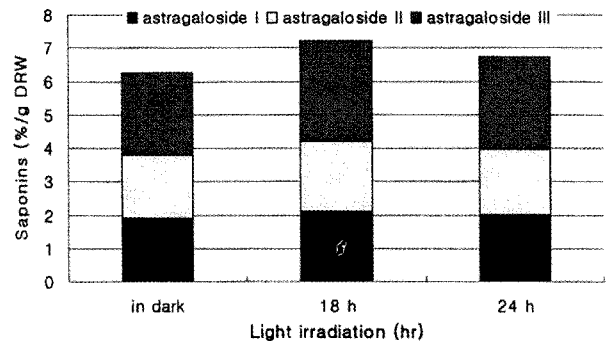


Figure 6. Effects of light irradiation on saponins accumulation in hairy root cultures of *A. membranaceus*.

요 약

황기의 형질전환된 모상근으로부터 약리물질인 astragalosides I, II, 그리고 III을 효율적으로 생산하기 위하여 다양한 물리화학적 조건들 즉, 배지, 초기 당농도, 교반속도, 초기 접종농도, 광조사, 그리고 chitosan 처리에 의한 elicitation 효과를 조사 하였다. 선발된 AG-04 clone의 성장과 astragalosides의 함량은 4종의 배지들 중 SH배지에서 가장 좋았으며, 배지에 첨가하는 초기 당 농도는 3%와 6%에서 각기 건물중과 astragalosides의 함량이 가장 높게 나타났다. 또한, 초기 접종량은 50 ml 배지에 500 mg (FRW) 씩을 주입하는게 가장 효과적이었으며, 18시간 광조사가 되는 Shaking incubator에서 90 rpm과 120으로 교반시켰을 때 모상근의 성장과 astragalosides의 함량이 높게 나타났다. 배양 2주 후 chitosan의 처리는 모상근의 성장에는 크게 영향을 미치지 않았으나, 100 mg/L 처리구에서 대조구의 약 2.1배의 astragalosides 함량 증가를 가져왔다. 이와같은 연구결과는 황기의 대량배양을 통한 saponins 생산 연구에 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 본다.

REFERENCES

- Giri, A. and M. L. Narasu (2000), Transgenic hairy roots : recent trends and applications, *Biotechnology Adv.* **18**, 1-22.
- Dornenberg, H. and D. Knorr (1995), Strategies for the improvement of secondary metabolites production in plant cell cultures, *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 674-684.
- Taya, M., Yoyama, A., Kando, O., Kobayashi, T., and T. Matsui (1989), Growth and characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors, *J. Chem. Eng. Jpn.* **22**, 74-89.
- Rodriguez-Mendiola, M. A., Stafford, A., Cressuel, R., and C. Arias-Castor (1991), Bioreactors for growth of plant roots, *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 697-702.
- Bais, H. P., George, J., and G. A. Ravishankar (1999), Production of esculin by hairy root cultures of *C. intybus* L. *Indian, J. Exp. Biol.* **37**, 269-273.
- Scheidegger, A. (1990), Plant biotechnology goes commercial in Japan, *Trends Biotechnol.* **8**, 197-198.
- Paek, K. Y. and E. J. Han (2002), Commercial production of *P. ginseng* using bioreactor system, In *10th IAPTC & B Congress: Plant Biotechnology 2002 and Beyond*, Eds. IAPTC & B Congress Org. USA, p-144
- Chang, H. and P. But (1987), Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica, pp.1041-1046 Singapore: World Scientific.
- Ma, X. Q., Shi, Q., Duan, J. A., Dong, T. T., and K. W. Tsim (2002), Chemical analysis of Radix Astragali in China: a comparison with its adulterants and seasonal variations, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4861-4866.
- Shao, B. M., Xu, W., Dai, H., Yu, P., Li, Z., and X. M. Gao (2004), A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *A. membranaceus*, a China medicinal herb, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1103-1111.
- Yin, X., Zhang, Y., Wu, H., Zhu, X., Zheng, X., and S. Jiang (2004), Protective effects of *Astragalus* saponin I on early stage of diabetic nephropathy in rats, *J. Pharmacol. Sci.* **95**, 256-266.
- Vertta, L., Guerrini, M., El-Sebakhy, N. A., Asaad, A. M., Toaima, S. M., and M. E. Abou-Sheer (2001), Cycloartane saponins from *A. peregrinus* as modulators of lymphocyte proliferation, *Fitoterapia* **72**, 894-905.
- Zhou, Y., Hirotani, M., Rui, H., and T. Furuya (1995), Two triglycosidic triterpene astragalosides from hairy root cultures of *A. membranaceus*, *Phytochemistry* **38**, 1407-1410.
- Hiraton, M., Zhou, Y., Rut, H., and T. Furuya (1994), Cycloartane triterpene glycosides from the hairy root cultures of *A. membranaceus*, *Phytochemistry* **37**, 1403-1407.
- Hiraton, M., Zhou, Y., Lui, H., Rut, H., and T. Furuya (1994), Astragalosides from hairy root cultures of *A. membranaceus*, *Phytochemistry* **36**, 665-670.
- Murashige T. and F. Skoog (1969), A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Hwang, S. J., Kim, K. S., Pyo, B. S., and B. Hwang (1999), Saponin production by hairy root cultures of *P. ginseng*, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **4**, 309-312.
- Schenk R. V. and A. C. Hildrbrandt (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.
- Ionkova, I., Kartnig, T., and W. Alfermann (1997), Cycloartane saponin production in hairy root cultures of *A. mongholicus*, *Phytochemistry* **45**, 1597-1600.
- Linsmaier, E. M. and F. Skoog (1965), Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* **18**, 100-127.
- 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.
- 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.
- Zhong, J. J. (2000), Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **71**, 1-24.
- Wang, H. Q., Yu, J. T., and J. J. Zhong (2000), Significant improvement of taxaneproduction in suspension cultures of *T. chinensis* by sucrose feeding strategy, *Process. Biochem.* **35**, 479-483.
- 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.
- Zhang, C. H., Wu, J. Y., and G. Y. He (2002), Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *T. yunnanensis* cell cultures, *App. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 396-402.
- Kanokwaree, K. and P. M. Doran (1997), Effects of inoculum size on growth of *A. belladonna* hairy roots in shake flasks, *J. Fermentation & Bioeng.* **4**, 378-381.
- Bhadra, R. and J. V. Shanks (1995), Statistical design of the effect of inoculum conditions on growth of hairy root cultures of *C. roceus*. *Biotechnol. Techniques.* **9**, 681-686.
- 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.
- Wu, S., Y. Zu, and M. Wu (2003), High yield production of salidroside in the suspension culture of *R. sachalinensis*, *J. Biotechnol.* **106**, 33-43.
- Funk, C. and P. Brodelius (1990), Influence of growth regulators and an elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *V. planifolia*, *Phytochemistry* **29**, 845-848.
- Hwang, S. J. (2005), Characteristics of growth and catalpol production in *R. glutinosa* hairy roots transformed with *A. rhizogenes* ATCC15834, *J. Plant Biol.* (in press).
- Merkli, A., Christen, P., and I. Kapetanidis (1997), Production of diosgenin by hairy root cultures of *T. foenum-graecum* L. *Plant Cell Rep.* **16**, 632-636.
- Bhadra, R., Morgan, J. A., and J. V. Shanks (1998), Transient studies of light-adapted cultures of hairy roots of *C. roceus* : growth and indole alkaloid accumulation, *Biotechnol. & Bioeng.* **60**, 670-678.
- Seitz, H. U. and W. Hindere (1988), Anthocyanin. In *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 5, F. Constabel and I. Vasil, Eds. Academic Press, San Diego, pp.49-76.
- Tabata, M., Mizukami, H., Hiraoka, N., and M. Konoshima (1974), Pigment formation in callus cultures of *L. erythrorhizon*, *Phytochemistry* **13**, 927-932.
- Mulder-Krieger, T., Verpoorte, R., Svendse, A., and J. Scheffer (1988), Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review, *Plant Cell, Tissue & Org. Cult.* **13**, 85-114.