

하늘타리 형질전환근의 생장 및 Trichosanthin의 생합성을 위한 최적화

황성진*† · 나명석**

*동신대학교 한약재산업학과, **광주여자대학교 미용과학과

Optimal Culture Conditions for Transformed Root Growth and Trichosanthin Formation in *Trichosanthes kirilowii* Max.

Sung Jin Hwang*† and Myung Suk Na**

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

**Department of Beauty Science, Kwangju Women's University, Kwangju 506-713 Korea.

ABSTRACT : Transformed hairy roots were induced from *in vitro* grown plantlets of *Trichosanthes kirilowii* by infection with *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC15834. Transformed hairy roots exhibited active growth with high branching of roots on plant growth regulators-free medium. Cloned line (TR-03) of hairy root was tested for its growth and extracellular protein accumulation in medium under various culture conditions. Among the culture media tested, a full-strength MS medium had a pronounced effect on root biomass and extracellular protein accumulation in medium. The maximum root biomass (2.4 g DRW/flask) and extracellular total protein contents (28.3 ug/ml) in medium was obtained at inoculum size of 2 g (FRW) and in MS medium supplemented with 4% sucrose. In addition, the optimal shaking speed for root growth and extracellular protein accumulation in medium were 100 rpm. The total extracellular protein concentration reached a maximum of 28.3 ug/ml at 4 weeks and decreased thereafter. Protein translation inhibitory activity was observed in culture broths and reached levels of 21.3 unit. These studies demonstrate that the transformed hairy roots can be utilized for the *in vitro* production of ribosome-inactivating proteins.

Key Words : trichosanthin, biomass, hairy root clone, *Trichosanthes kirilowii*.

서 언

하늘타리 (*Trichosanthes kirilowii* Max.)는 중남부 지역에 자생하는 다년생 초본으로 한방에서는 열매와 뿌리를 해열, 해수, 이뇨, 변비, 어혈, 황달, 피부병, 적백리, 당뇨등의 치료에 사용하고 있다 (Zhu, 1998). 하늘타리의 종자와 근경에서는 trichosanthin (TCN), TAP-29, trichokirin, α -kirilowin, β -kirilowin, 그리고 karasurin과 같은 다양한 ribosomal inactivating protein (RIP)들이 생합성되어지는 것으로 알려지고 있다 (Lee-Huang *et al.*, 1991; Toyokawa *et al.*, 1991; Casellas *et al.*, 1988; Dong *et al.*, 1994). 항암작용과 항진균작용, 그리고 HIV의 활동을 억제하는 효과를 나타내는 trichosanthin은 세포질에서 모두 289개의 아미노산으로된 전구체가 만들어지며, 이 후 사슬의 양끝 일부가 제거되는 전사후 과정을 통해 최종적으로 분자량 24-29 kDa의 monomeric nonglycosylated protein을 형성한다 (Chow *et al.*, 1990). 켈

러스나 헤파타배양세포와 같은 탈분화된 세포에서는 계대배양과정에서 지표물질의 생합성이 지속적으로 유지되지 않거나 체세포변이가 발생할 수 있다. 이에비해 토양세균인 *Agrobacterium rhizogenes* 감염에 의해 식물호르몬 생합성 조절 유전자를 포함하는 T-DNA가 식물게놈내로 전이되어 유도되는 형질전환된 부정근 (일명 모상근)은 탈분화된 세포에 비해 장기간 계대배양과정에서 유전적으로나 생화학적으로 안정성을 갖기 때문에 식물유래 유용물질의 생산 연구에 있어서 매우 적합한 소재로 알려지고 있다 (Shank and Morgan, 1999). 그러나, 모상근의 경우 형질전환 과정에서 무작위적 T-DNA의 삽입으로 인한 삽입돌연변이가 발생하기 때문에 탈분화된 세포를 이용할때와 마찬가지로 실험목적에 적합한 세포주를 선발하는 과정을 일차적으로 거쳐야 하며, scale-up을 위해서는 플라스크배양 단계에서 지표물질의 생합성을 최대로 유도해 낼 수 있는 물리화학적 배양조건이 규명되어야 한다. 최근 국내 (*in vitro*)에서 배양된 하늘타리의 세포나 조직에서 다소 차

†Corresponding author: (Phone) +82-33-3225 (E-mail) jimhwang@naver.com
Received January 16, 2007 / Accepted January 31, 2007

이는 있으나 모식물체의 근경에서와 같은 TCN의 생합성이 이루어짐을 확인한 바 있다 (Thorup *et al.*, 1994; Savary and Flores, 1994; Stoner *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1999). 그러나, 형질전환된 모상근의 생체량을 증가시키거나 약리효능을 갖는 TCN의 생합성을 최대화 할 수 있는 연구는 아직 이루어진 바 없다.

본 연구에서는 *A. rhizogenes* ATCC15834를 이용하여 형질전환된 하늘타리의 모상근에 대해 플라스크배양 단계에서의 TCN의 생합성과 생체량을 최대화할 수 있는 배양 조건의 규명과 함께 배지내로 배출된 단백질의 RIP 활성을 조사 하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

하늘타리 (*Trichosanthes kirilowii* Max.)의 종자는 일본 쓰꾸마 약용작물시험장으로부터 분양받아 실험 재료로 사용하였다. 하늘타리 종자의 표면살균을 위해 70% (v/v) ethanol과 5% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 각각 5분간 침지시킨 후 멸균된 무균수로 3-4회 세척하였다. 이 후 멸균된 filter paper를 사용하여 여분의 수분을 제거한 다음 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 1/2MS배지 (2% sucrose)에 치상하고 광이 12시간 조사되는 항온실 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$)에서 무균적으로 발아를 유도 하였다.

2. 배지조제

실험에 사용된 모든 배지는 무기염과 탄소원인 sucrose를 넣은 후 1 N NaOH를 사용하여 초기 pH를 5.8로 조정하였다. 액체배지는 100 ml Elenmyer flask에 조제한 배지를 50 ml 씩 분주한 후 121°C 에서 15분간 감압멸균 처리하였으며, 고형배지의 경우 0.3% (w/v) phytigel (Sigma-Aldrich, USA)을 첨가하여 증탕을 한 후 감압멸균 하였다. 한편, 항생제와 식물생장조절물질 첨가배지는 0.2 μm pore size의 membrane filter를 사용하여 여과멸균한 다음 멸균된 배지에 첨가 하였다.

3. 모상근 배양

발아 후 6주 이상 배양된 유식물체로 부터 잎을 절취한 후 cork-borer를 사용하여 직경 1 cm 크기의 잎 disc를 만들고 여기에 감자추출물배지에서 48시간 배양한 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834를 접종하여 24시간 암소에서 유지시켰다. 균과의 공조배양 후 잎 disc를 무균수로 3회 세척하여 200 mg/l cefotaxime (Sigma-Aldrich, USA)이 첨가된 MS배지에 치상 하였다. 식물호르몬이 첨가되지 않은 MS배지에서 잎 disc로부터 유기된 부정근은 근단부위로부터 약 1.5 cm 길이로 절취하여 무기염의 농도를 절반으로 줄인 1/2MS배지에

치상하였으며, 배양 2주 후부터 부정근의 성장속도와 분지화 형태등을 중심으로 clones을 선발하였다. 이 후 모든 실험은 선발된 clone을 사용하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962), 무기염의 농도를 절반으로 줄인 MS (1/2MS), WPM (Lloyd and McCown, 1981), 그리고 B5 (Gamborg, 1968) 배지를 사용하였으며, 탄소원인 sucrose는 2%에서부터 8%까지 농도를 달리하여 배지에 첨가 하였다. 초기 접종량에 의한 영향을 조사하기 위해 근단이 포함된 약 1.5 cm 길이의 모상근을 2, 4, 6 그리고 8 g (생중량)씩 50 ml씩 배지가 들어 있는 Elenmyer flask에 접종하였으며, 교반속도는 60에서부터 120 rpm까지 각기 속도를 달리 하였다.

4. Biomass 측정

액체배지에서 4주 동안 배양된 하늘타리의 모상근을 수거하여 여과지에서 24시간 탈수 시킨 뒤 생중량 (FRW)을 측정하고, 동일 시료를 냉동건조기 (EYELA, Japan)에서 48시간 건조한 후 건중량 (DRW)을 측정 하였다.

5. 단백질 정량

4주 배양후 배지만을 수거하여 15,000 g에서 15분간 원심분리한 다음 상층액을 취하고 침전물은 PBS buffer에 재현하여 반복하여 단백질을 추출하였다. 3회 반복하여 수집한 추출액은 0.2 μm syringe filter로 여과하여 불순물을 제거 시킨 후 Bradford 방법 (Bradford, 1976)에 따라 가용성 총단백질 (TSP) 함량을 측정 하였다. 이 때 표준곡선은 BSA (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다.

6. RIP 활성 조사

RIP활성은 cell-free rabbit reticulocyte lysate system (Promega, USA)을 사용하여 protein translational의 억제능력을 통해 측정하였다. Manual에 따라 추출 농축된 단백질 추출물 2.5 ul를 5 ul rabbit reticulocyte lysate와 혼합하여 15분간 유지시킨 후 여기에 1 ul protein translation cocktail을 처리하고 2시간 동안 30°C 에서 반응시킨 다음 Luminometer (MGM, USA)에서 luciferase activity를 측정 하였다.

결과 및 고찰

가내 (in vitro)에서 배양된 하늘타리 유묘로부터 절취한 잎 disc에 *A. rhizogenes* ATCC15834의 감염을 통해 형질전환된 부정근을 유도 하였다. 형질전환된 모상근은 식물게놈내로 전이된 T-DNA에 위치한 식물호르몬 생합성 조절유전자의 발현으로 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 무기염 배지에서 생체량의 증가가 급속히 이루어지는 특징을 갖는다. 일반적으로 모상근은 생장부의 비대생장 보다는 새로운 뿌리의 분화가 앞



Fig. 1. Hairy root clone of *T. kirilowii* cultured on hormone-free MS medium.

서 진행되기 때문에 형태학적으로 굵기가 가늘고 굴지성 반응을 나타내지 않는 것으로 알려지고 있다. 또한 배지에 식물생장조절물질을 전혀 첨가하지 않은 무기염배지에서도 활발한 분지화와 생장을 하게됨으로써 정상적인 뿌리에 비해 수십에서 수백배 빠른 생체량의 증가 속도를 나타낸다.

*A. rhizogenes*에 의해 유도되는 모상근의 형태는 숙주식물의 유전적 특성이나 T-DNA의 전이과정에서 숙주식물의 게놈내에 삽입 위치에 따라 다양한 변이체가 나타날 수 있다. 하늘타리의 잎 disc로부터 유기한 모상근의 경우에는 근단으로부터 멀어질 수록 비대해지며 근모 (root hairs)가 발달하는 독특한 모양을 보여주었다 (Fig. 1). 본 실험에 앞서 수행한 예비 실험결과 국내에서 지역별로 채집한 하늘타리 종들에서 유도시킨 모상근들에서 비슷한 양상을 보여줌으로써 삽입돌연변이에 의한 현상이라기 보다는 숙주 식물의 유전적인 특성에 기인한 것으로 사료되었다 (data not shown). 하늘타리의 잎 disc로부터 형성된 부정근을 근단부위가 포함되도록 절취하여 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 1/2MS배지에 각기 분리하여 치상한 후 근단의 신장 속도와 분지화의 정도에 따라 7개 clones (TR-01, 02, 03, 04, 05, 07)을 1차적으로 선발하였다. 선발된 clone 각각을 고휘배지에서 배양한 후 근단부위가 포함되게 절취하여 동일조성의 액체배지에 재접종하고 4주 동안 암소에서 배양한 다음 생체량과 총단백질 양을 측정하여 3개의 clones (TR-01, 03, 05)을 최종적으로 선발하였다 (Table 1). 하늘타리 모상근의 생장에 적합한 기본배지를 조사하기 위하여 TR-03 clone의 근단부위가 포함되도록 약 1.5 cm 가량을 절취한 후 4종의 배지가 50 ml 씩 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 접종하였다. 4주동안 배양한 후 측정된 생체량과 배지 내 총가용성 단백질의 함량 모두 MS배지에서 2.4 g (건중량)

Table 1. Comparison of hairy root clones of *T. kirilowii* with biomass and extracellular protein accumulation in the medium.

Clones	Biomass (g DRW**/ flask)	Total protein (ug/ml)
TR-01	2.2 ± 0.4	27.1 ± 6.1
TR-03	2.4 ± 0.3	28.3 ± 5.1
TR-06	1.9 ± 0.7	24.2 ± 7.3

* Data represents the mean values ± SE of three independent experiments.

** DRW; dry root weights.

Table 2. Effect of medium components on biomass and extracellular protein accumulation in the medium.

Media	Biomass (g DRW**/ flask)	Total protein (ug/ml)
MS	2.4 ± 0.3	28.3 ± 5.1
1/2MS	2.1 ± 0.6	20.4 ± 6.2
B5	1.8 ± 0.4	18.7 ± 9.0
WPM	1.6 ± 0.3	16.8 ± 9.3

* Data represents the mean values ± SE of three independent experiments.

** DRW; dry root weights.

과 28.3 ug/ml로 가장 높게 나타났다 (Table 2). 이와같은 결과를 놓고 볼 때 하늘타리 모상근의 경우 MS배지에 비해 무기염의 농도가 낮은 1/2MS나 B5, 그리고 WPM배지가 모상근의 생육이나 단백질의 생합성에 적합하지 않은 것으로 보였다.

기내 (*in vitro*)에서 배양되는 식물세포나 조직은 광합성능이 현저히 낮은 일종의 타가영양적 생장을 하게된다. 따라서, 배지성분에 필수적으로 무기염과 함께 다량의 당이 첨가된다. 배지에 첨가하는 당으로는 주로 sucrose를 사용하며 간혹 glucose와 혼합하여 사용하는 경우도 있다. 배지내 당의 농도는 배지의 삼투농도까지를 고려하여 세포의 성장과 물질의 생합성을 극대화 할 수 있도록 2%에서부터 12% 까지 다양하게 처리하고 있다 (Misawa, 1985; Knobloch and Berlin, 1980; Sakamoto *et al.*, 1993). 하늘타리 모상근의 경우에는 배지에 첨가하는 탄소원으로 sucrose를 4% 농도로 첨가하여 주는게 바람직한 것으로 나타났다 (Table 3). 배지내 초기 탄소원을 glucose나 fructose를 단독으로 처리하거나 sucrose와 함께 처리하였을 경우 모두에서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다 (data not shown). 이는 Stoner등 (1997)이 하늘타리의 현탁세포배양에서 sucrose, glucose, 그리고 fructose를 각기 처리하였을 경우 sucrose는 배양 일주일 이내에 glucose와 fructose로 전환되어 식물세포에 흡수되어짐으로써 결과적으로 sucrose를 처리하는게 바람직하다는 연구결과와 일치한다. 한편, sucrose의 농도가 6% 이상에서는 시간이 경과함에 따라 근단 부위의 손상과 함께 분지화가 억제되는 경향이 나타났는데 이는 배지의 삼투농도의 증가에 따른 영향으로 사료되었다.

Table 3. Effect of initial sucrose concentration on biomass and extracellular protein accumulation in the medium.

Sucrose conc. (%)	Biomass (g DRW**/flask)	Total protein (ug/ml)
2	2.0 ± 0.6	21.3 ± 6.2
4	2.4 ± 0.4	28.3 ± 5.2
6	1.8 ± 0.5	19.7 ± 9.3
8	1.4 ± 0.7	15.8 ± 8.0

* Data represents the mean values ± SE of three independent experiments.

** DRW; dry root weights.

Table 4. Effect of inoculum density on biomass and extracellular protein accumulation in the medium.

Initial density (g FRW)	Biomass (g DRW**/flask)	Total protein (ug/ml)
2	2.4 ± 0.3	28.3 ± 5.1
6	2.1 ± 0.6	26.3 ± 6.9
8	1.6 ± 0.4	19.7 ± 9.0
10	1.4 ± 0.5	14.8 ± 8.3

* Data represents the mean values ± SE of three independent experiments.

** DRW; dry root weights.

현탁배양에 있어서 교반속도와 교반방식은 식물세포의 증식이나 물질의 생합성에 있어서 영향을 주는 또다른 요인이다. 모상근과 같은 배양체의 침전을 막고 산소의 공급을 위해서는 반드시 교반이 필요하다. 그러나, 과도한 교반속도는 오히려 식물세포에 심한 물리적 충격을 주게되어 세포의 증식이 억제되고 결과적으로 물질의 생산성에 현저히 낮아지는 결과를 가져올 수 있다 (Kreis and Reinhard, 1989). 하늘타리 모상근의 경우 시료의 접종 농도를 2 g (생중량) (Table 4)으로 하고 교반속도를 80-100 rpm으로 유지해 주었을 때 4주 후 생체량이 약 2.4 g (건중량)으로 초기 접종량에 비해 100배 이상 증가하였다 (Table 5). 시료의 초기 접종 농도를 8g까지 높여 접종한 후 생체량을 측정할 결과 접종량 증가에 따른 생체량 증가는 비례하지 않았다. 오히려 초기 농도를 6g 이상으로 높여 접종할 경우 플라스크내에서 초기 생체량의 증가는 빠르게 이루어졌으나 4주 후 측정할 시료의 생체량에 있어서는 오히려 낮았다. 한편, 교반속도는 대부분 식물세포배양에서 처럼 60 rpm 이하의 저속으로 유지하였을 경우 생체량이 증가함에 따라 배양체의 침하가 이루어졌으며 이로인해 4주 후 침하된 모상근의 근단부위에서는 갈변화현상을 확인할 수 있었다. 반면, 120 rpm 이상 고속으로 교반시킬 경우 shear stress에 의해 모상근의 분지화가 억제되었으며, 이로인해 생체량과 총 단백질 합성량 모두 현저히 낮아지는 결과를 가져왔다. Stoner등 (1997)은 하늘타리 세포의 현탁배양에서 50 rpm 보다 100 rpm으로 교반하였을 때 배지내 총가용성 단백질의 함량 증가하였

Table 5. Effect of shaking speed on biomass and extracellular protein accumulation in the medium.

Shaking speed (rpm)	Biomass (g DRW**/flask)	Total protein (ug/ml)
60	1.3 ± 0.2	16.3 ± 8.2
80	2.3 ± 0.5	24.3 ± 7.0
100	2.4 ± 0.5	28.3 ± 9.3
120	1.1 ± 0.4	11.8 ± 9.1

* Data represents the mean values ± SE of three independent experiments.

** DRW; dry root weights.

Table 6. Protein translation inhibitory activity of *T. kirilowii* hairy root crude extracts.

Culture periods (weeks)	Total protein (ug/ml)	RIP activity (units)
2	10.9 ± 6.0	14.3 ± 3.1
4	28.3 ± 5.2	21.3 ± 2.3
6	24.3 ± 7.1	11.2 ± 3.0

* Data represents the mean values ± SE of three independent experiments.

으며, 이는 높은 교반속도가 세포밖으로 단백질 용출을 촉진하였을거라고 보고한 바 있다. 그러나, 본실험 결과 교반속도를 높였을 경우 나타나는 생체량과 배지내 총가용성 단백질의 증가는 높은 교반속도로 인해 가해지는 강한 물리적 자극이 세포로부터 배지로의 단백질 용출을 가속화 시킨다기 보다는 배지내 통기성의 증가로 인한 모상근 조직세포의 활성 증가와 단백질과 같은 대사물질의 생합성에 영향을 줌으로써 전반적인 상승효과를 나타낸 것으로 사료 되었다.

식물세포는 대부분 생합성된 대사물질을 세포밖으로 용출되기 보다는 세포질 또는 액포에 저장한다. 따라서, 배양된 식물 세포로부터 생합성된 대사물질을 세포밖으로 용출해 내기 위해서는 액포막이나 세포막의 투과성을 높이는 isopropanol, dimethylsulfoxide, chitosan을 처리하는 경우가 있으나 실제로 생산성의 효율을 크게 높여주지는 못하고 있다 (Van Uden *et al.*, 1990; Beaumont and Knorr, 1987; Knorr and Teutonico, 1986). 하늘타리의 현탁배양세포와 모상근의 배양과정에서 낮은 효율이지만 TCN을 포함한 분자량 20,000-36,000 크기의 단백질은 배지로 용출되어짐을 확인한 바 있다 (Savary and Flores, 1994; Stoner *et al.*, 1997). Table 6은 하늘타리 모상근을 6주간 배양하면서 배지에서 수거한 가용성 단백질의 함량 변화와 이들 단백질에 대한 RIP활성을 측정할 결과이다. 배지내 가용성 단백질 함량은 2주 후부터 증가하였으며, 4주 후부터는 유의적인 증가를 보이지 않았는데 이는 플라스크 단계의 배양에서 정체가 상태에 들어선 모상근의 생장 속도 감소, 세포내 대사활동의 둔화, 그리고 배지로 용출된 단백질의

가수분해에 의한 결과로 보였다. 따라서, 대규모 배양단계에서의 하늘타리의 모상근 배양체로부터 TCN의 생산을 위해서는 연속배양 시스템을 활용하여 모상근의 생장을 지속적으로 유지시키면서 배지에 방출된 단백질을 회수하는게 바람직 할 것으로 사료되었다.

적 요

하늘타리 (*Trichosanthes kirilowii*)로부터 조직배양 기법을 이용하여 약리작용을 나타내는 생리활성물질인 trichosantin을 생산하기 위한 연구로 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834의 감염을 통하여 기내 배양된 유묘의 잎절편으로부터 형질전환 모상근을 유도하였다. 유도된 모상근 clones으로부터 성장속도와 분지화 정도가 빠르며 단백질 합성능이 가장 우수한 TR-03 clones을 선발하였으며, 이를 사용하여 생체량과 배지내 가용성 단백질의 생산을 최대로 높일 수 있는 최적 배양조건을 조사하였다. TR-03 clone을 4% sucrose가 첨가된 MS 배지에 초기 접종농도 2g (생중량)을 접종하여 100 rpm으로 배양시 생중량과 배지내 가용성 총단백질의 함량이 플라스크당 약 2.4g (건중량)과 28.3 ug/ml 으로 최대치를 나타내었다. 한편, 배지내 가용성 단백질에 대한 RIP활성 검정에서 배양 4주 후 21.3 unit로 최대치를 보였다.

LITERATURE CITED

- Beumont MD, Knorr D** (1987) Effects of immobilizing agents and proceduers on viability of cultured celery (*Apium graveolens*) cells. *Biotechnol. Lett.* 9:377-382.
- Casellas P, Dussosoy D, Falasca AL, Barbieri L, Guillemot JC, Ferrara P, Bolognesi A, Cenini P, Stirpe F** (1988) Trichokirin, a ribosome-inactivating protein from seeds of *Trichosanthes kirilowii* Max. Purification, partial characterization and use for preparation of immunotoxins. *Eur. J. Biochem.* 176: 581-588.
- Chow TP, Feldman RA, Lovett M, Piatak M** (1990) Isolation and DNA sequence of a gene encoding alpha-trichosantin, a type I ribosome-inactivating protein. *J. Biol. Chem.* 265:8670-8674.
- Dong TX, Nag TB, Yeung HW, Wong RN** (1994) Isolation and characterization of a novel ribosome-inactivating protein, beta-kirilowin, from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Max. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:387-393.
- Gamborg ON, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- Jin UH, Chun JA, Han MO, Lee JW, Yi YB, Lee SW, Chung CH** (2005) Sesame hairy root cultures for extra-cellular production of a recombinant fungal phytase. *Process Biochem.* 40:3754-3762.
- 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* 35:551-556.
- Knorr D, Teutonico RA** (1986) Chitosan immobilization and permeabilization of *Amaranthus tricolor*. *J. Agric. Food Chem.* 34:582-585.
- Kreis W, Reinhard E** (1989) The production of secondary metabolites by plant cells cultivated in bioreactors. *Planta Med.* 55:409-416.
- Lee-Huang S, Huang PL, Kung HF, Li BQ, Huang PL, Huang P, Huang HI, Chen HC** (1991) Tap 29: an anti-human immunodeficiency virus protein from *Trichosanthes kirilowii* that is nontoxic to intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6570-6574.
- Lloyd G, McCown B** (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. *Proc. Intl. Plant Proc. Soc.* 30:421-427.
- McDonald KA, Stoner MR, Shih NR, Jackson AP** (1999) *Trichosanthes kirilowii* plant cell culture in a 5L bioreactor. In: *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients*, Fu *et al.* ed. Kluwer Acad. Plenum Pub. NY p. 185-193.
- Misawa M** (1985) Production of useful plant metabolites. In: Fiechter A., Ed. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Berlin, Springer-Verlag, p. 59-88.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Shanks JV, Morgan J** (1999) Plant hairy root culture. *Curr. Opinion Biotech.* 10:151-155.
- Stoner MR, Humphrey CA, Coutts DJ, Remi-Shih NJ, McDonald KA, Jackman AP** (1997) Kinetics of growth and ribosome-inactivating protein production from *Trichosanthes kirilowii* plant cell cultures in a 5L bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 13:799-804.
- 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.
- Savary BJ, Flores HE** (1994) Biosynthesis of defense-related proteins in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* Max. var japonica. *Plant Physiol.* 106:1195-1204.
- Thorup JE, McDonald KA, Jackman AP, Bhatia N, Dandekar AM** (1994) Ribosome-inactivating protein production from *Trichosanthes kirilowii* plant cell cultures. *Biotechnol. Prog.* 10: 345-352.
- Toyokawa S, Takeda T, Ogihara Y** (1991) Isolation and characterization of a new abortifacient protein, karasurin, from root tubers of *Trichosanthes kirilowii* Max. var. japonicum Kitam. *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* 39:716-719.
- Van Uden W, Pras N, Malingre T** (1990) On the improvement of the podophylotoxin production by phenylpropanoid precursor feeding to cell cultures of *Podophyllum hexandrum* Royle. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 23:217-224.
- Zhu YP** (1998) In: *Chinese Materia medica*. Harwood Acad. Pub. p. 489-490.