

참깨 뿌리배양에 의한 hydroxymethylfurfural 생산

천재안 · 이진우 · 이영병¹ · 홍성식² · 조강진³ · 정정환*

동아대학교 생명공학과, ¹동아대학교 분자생명공학과, ²국립원예특작과학원, ³국립농업과학원 기능성식품과

Received November 19, 2009 / Accepted December 24, 2009

Production of Hydroxymethylfurfural by *Sesamum indicum* L. Root Cultures. Jae-An Chun, Jin-Woo Lee, Young-Byung Yi¹, Seong-Sig Hong², Kang-Jin Cho³ and Chung-Han Chung*. *Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, ¹Department of Molecular Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, ²National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-853, Korea, ³Functional Food and Nutrition Division, NAAS, Suwon 441-853, Korea* - Recently, hydroxymethylfurfural (HMF) has been highlighted as a key intermediate for the production of liquid bio-fuels and other valuable compounds. We used sesame roots as a biocatalyst to synthesize HMF using flask cultures. The synthesis of HMF was identified by GC-mass analysis. The highest root growth was observed in cultures with 1.0 mg/l NAA at 30°C, while root growth was not found in those without NAA treatment. When silver nitrate (AgNO₃) was added, the root growth was greatest in those treated with 0.5 mg/l AgNO₃ and cultured at 30°C. In the case of HMF synthesis, its highest yield was obtained in those treated with 0.5 mg/l NAA at 25°C, but low HMF was detected in those treated without naphthaleneacetic acid (NAA). The addition of AgNO₃ to the culture medium showed a 8-10% reduction in HMF yield compared to that of the control, indicating its inhibitory effect on the synthesis of HMF. On the whole, an optimal culture temperature for HMF synthesis seemed to be between 25-30°C.

Key words : Hydroxymethylfurfural, sesame, root cultures, biocatalysis

서 론

Hydroxymethylfurfural (HMF)에 관한 연구는 1800년대 후반부터 시작하여 현재까지 연구가 지속적으로 수행되고 있는 아주 오래된 연구 역사를 가지고 있는 중요한 화학물질이다 [7]. 최근의 연구보고에 의하면 HMF를 이용하여 미래의 바이오 액체연료로 사용 가능한 dimethylfuran (DMF)를 합성하는데 성공하였을 뿐 아니라 [11], 혈구성 빈혈(Sickle cell anemia)을 치료할 수 있는 의약품의 원료 물질로 인정되어 미국 FDA (Food and Drug Administration)는 HMF를 이 병의 치료약으로 제조할 수 있는 물질로 승인한 바 있다 [1]. 이러한 목적 이외에도 HMF는 anti-tyrosinase activity [12]를 가지는 특성이 있기 때문에 화장품의 미백 성분으로서도 활용성이 보고되어 있을 뿐 아니라, 식품이나 과일에서 저장 중에 생기는 갈변증 (browning)을 지연시키는 기능도 알려져 있다. 이러한 기능이 외에 부식이나 녹이 끼는 것을 방지하는 물질의 원료로 사용이 가능하고, 맛을 증진시키는 조미료의 원료로도 이용될 수 있을 뿐 아니라, 항공팽이 제제의 원료 물질로도 이용될 수 있고, 그 외 다른 중요 화합물질을 합성할 수 있는 중간생성 물질의 원료 화합물로서도 이용 가능하다. 이와 같이 HMF는 다양한 용도에 활용성이 아주 높을 뿐 아니라, 인체에도

거의 해가 없는 화합물질이기 때문에 미래의 주요 화학물질로서의 가치가 아주 높은 물질이지만 생산성이 아주 낮아 현재 까지 HMF의 대량 생산을 위한 산업화 연구는 거의 진전이 없었다 [7]. 그러나, 최근에 들어 HMF의 생산성이 종전에 비해서 월등히 개선된 HMF 합성 방법이 연속적으로 보고된 이후 부터 [10,17] HMF의 중요성이 재조명되어 HMF에 관한 관심이 높아지기 시작하였다.

HMF는 주로 화학적인 합성 방법으로 생산되어 왔으며, 생산 원료로 사용되고 있는 물질은 fructose, glucose, sucrose, mannose, xylose 등의 당 화합물들이다. 이들 당 화합물과 산 촉매 물질과 금속촉매들을 혼합하여 고온조건에서 여러 단계의 탈수반응(thermal dehydration)과정을 거쳐서 HMF 화합물이 합성되지만, 여러 단계의 당의 분해과정을 거치는 동안에 HMF 뿐 만 아니라 여러 종류의 furfural 유도 화합물이 섞여서 생산되거나, 생산된 HMF가 중합 반응을 하기 때문에 생산된 HMF의 생산량도 적을 뿐 아니라, 고 순도 HMF의 분리 정제도 쉽지 않은 단점이 있다. 따라서 이러한 단점들은 HMF의 생산 단가를 높이는 요인으로 작용하기 때문에 HMF를 산업적으로 생산하는 데 중요한 장애 요소가 되고 있다. 이러한 문제점에도 불구하고 현재까지는 이러한 화학적 합성 방법으로 HMF를 생산하고 있으며, 주로 연구용이나 실험실에서 소모하는 정도의 생산이 이루어지고 있는 것으로 알려져 있다.

바이오촉매(biocatalyst) 기술에서 주로 사용되고 있는 바이

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7583, Fax : +82-51-200-6536

E-mail : chchung@donga.ac.kr

오축매는 효소와 미생물이 주류를 이루고 있으나, 식물의 특정 세포나 조직 및 기관을 바이오축매로 이용하여 어떤 특정 화합물을 합성하는 기술도 다양하게 개발되어 있다[5]. 예를 들면, 당근의 뿌리를 바이오축매로 사용하여 어떤 특정 알코올을 합성하는 방법이 개발된 바 있고[3], 또 다른 연구자는[9] 뿌리배양을 통한 배양액의 물리적 특성을 변화시킬 수 있는 바이오축매 기술을 도입하여 어떤 물질의 합성을 간접적으로 증가시킬 수 있다는 실험적 증거를 제시하였다.

위에서도 언급된 바와 같이 HMF는 다양하게 활용될 수 있는 화합물질임에도 불구하고 산업화가 미미한 주된 이유는 생산 단가가 높아서 HMF를 이용하여 제품화를 목적으로 하는 경우에는 가격 경쟁력이 낮아진다는 단점이 있기 때문이다. 따라서 HMF를 최대한 활용하기 위해서는 HMF의 생산 단가를 낮출 수 있는 생산 공정기술의 개발이 중요시 되고 있다. 따라서 본 연구에서는 식물의 뿌리를 바이오축매로 이용한 뿌리배양을 통하여 HMF를 생산할 수 있는 기초 기술을 개발하였으며, 그에 관한 실험 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 준비 및 뿌리배양

참깨(*Sesamum indicum* L.) 종자를 0.5% Dichloro-isocyanuric acid에 2시간 동안 살균처리를 한 다음에 멸균수에 세 번 세척하였다. 3% sucrose가 첨가된 MS 고체배지를 121°C에서 18분 동안 고압 멸균처리를 한 후에 이 고체배지에서 16시간 동안의 명 상태와 8시간 동안의 암 상태에서 일주일간 배양하여 생장한 어린 참깨뿌리 200 mg을 500 ml 삼각플라스크에서 옮겨 암 상태에서 배양하였으며[6], 식물생장조절제로 사용된 NAA의 농도는 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/l의 네 종류로 나누어서 각각 첨가되었다. Silver nitrate (AgNO_3)가 첨가되는 처리구에서는 MS 액체배지 200 ml가 담긴 플라스크에 0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l의 농도로 각각 첨가되었으며, 배양온도는 25°C, 30°C의 조건으로 암 상태에서 3주 동안 배양하여 실험 재료로 사용하였으며, 이렇게 생장한 배양뿌리의 무게를 측정하였다. HMF의 측정을 위한 실험 재료는 배양액을 Whatman No. 2 여과지로 배양을 여과한 후에 진공 냉동하여 HMF 측정 시료를 준비하였다. 각 실험 측정치는 다섯 반복을 수행하여 얻어진 평균치를 표준편차로 계산하였다.

Gas chromatography-mass (GC-MS) 분석 방법

배양액으로부터 HMF의 합성 여부를 확인하기 위하여 GC-MS 분석 방법이 사용되었다. 냉동 건조된 시료를 0.1 g 정도 평량하여 원심분리용 tube에 담은 후에 100% 메탄올을 10 ml 부은 다음 sonicator로 1 시간 정도 추출하였다. 이 추출액을 여과한 후에 진공증류기로 농축한 후에 100% 메탄올에

재용해시켜 분석용 병에 담아 측정하였다. 시료 분석용 칼럼은 silica capillary column (DB-5; 30 m × 0.25 mm; J&W)가 사용되었고, column oven 온도는 50°C에서 5분, 50-110°C에서 분당 5°C로, 그리고 110°C-180°C에서 분당 10°C, 마지막으로 180-220°C에서 분당 5°C 온도로 column 온도를 조정하여 분석하였으며, 사용된 GC-MS는 HPG1800B GC-MS spectrometer가 사용되었고, 피크가 나온 화합물은 Willy library의 분석 data와 비교하여 HMF를 확인하였다.

GC (Gas chromatography) 분석에 의한 HMF 측정 방법

합성된 HMF의 정량을 위해서 GC 분석 방법이 수행되었다. 진공냉동 시료를 위에서와 동일한 방법으로 준비하였고, 시료의 분석을 위해 HP5890 series II GC (Hewlett Packard, USA)가 사용 되었으며, 측정 조건은 다음과 같이 수행되었다. 사용된 column은 DB-5MS (30 m × 0.25 mm)였고, column oven 온도 130°C, injector 온도 230°C, split ratio는 25:1, 그리고 detector는 FID (flame ionization detector)를 사용하였으며, detector 온도는 230°C로 조정하여 측정하였다.

결과 및 고찰

참깨의 뿌리생장에 미치는 배양온도 및 NAA의 영향

이 연구의 성공적인 결과를 도출하기 위해서는 먼저 참깨의 뿌리생장의 적정조건이 확립되어야 한다. 따라서 참깨의 뿌리생장에 필수적인 식물 옥신(auxin) 생장조절제를 선별하기 위한 예비실험이 수행되었다. 이를 위해 세 종류의 식물생장조절제(IAA; indole 3-acetic acid, IBA; 3-indolebutyric acid 및 NAA; naphthaleneacetic acid)를 사용하여 예비실험이 수행되었다. 이 결과에 의하면 NAA가 가장 효과적이라는 사실이 얻어졌기 때문에 NAA가 식물생장조절제로 선별되었다. 이어서 참깨의 뿌리생장에 가장 적합한 NAA의 적정 농도와 적정 배양온도를 검토하기 위하여 네 종류의 NAA 농도 (0.0 mg/l, 0.1 mg/l, 0.5 mg/l 및 1.0 mg/l)를 사용하여 25°C와 30°C의 두 배양온도에서 배양되었다. 실험결과를 Fig. 1과 Fig. 2에 잘 나타나 있으며, NAA 무처리에서는 두 배양온도 모두에서 참깨의 뿌리생장이 전혀 생기지 않은 반면에, NAA가 첨가된 배양에서는 두 배양온도에서 뿌리의 생장이 확인되었으며(Fig. 2), 이 결과는 참깨의 뿌리생장에는 NAA가 필수적으로 요구된다는 사실을 보여주었으며, 이는 식물의 뿌리생장에는 일반적으로 옥신이 중요한 역할을 한다는 사실과 일치하는 실험결과로 생각되었다[5]. 그리고 뿌리의 생장이 가장 높은 처리구는 30°C에서 NAA의 농도가 1.0 mg/l로 첨가된 처리구에서 측정되었으나 25°C에서 배양된 뿌리생장과의 차이는 거의 없었다(Fig. 1). 위의 실험 결과로 볼 때 참깨의 뿌리배양을 위해서는 25-30°C가 적합하다는 결론이 얻어졌다.

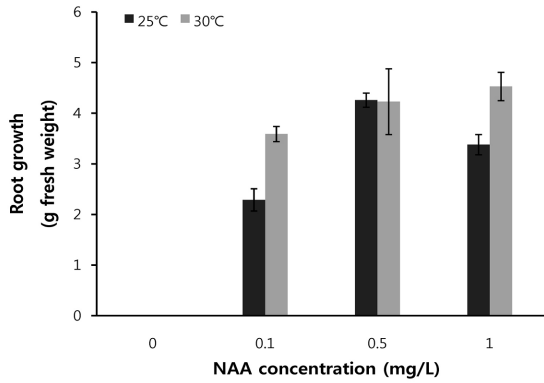


Fig. 1. Effect of NAA on the growth of sesame roots in the flask cultures at two temperatures of 25°C and 30°C. Each treatment is the means value of 5 replications with standard deviation.

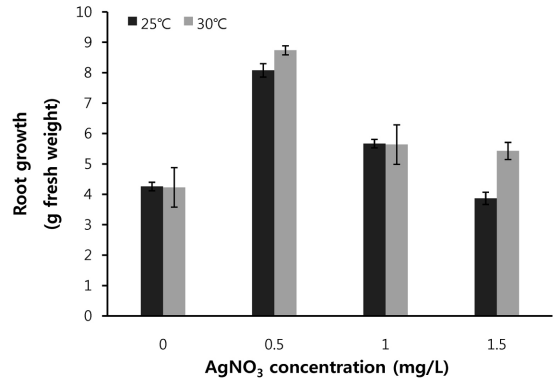


Fig. 3. Effect of silver nitrate (AgNO₃) on the growth of sesame roots in the flask cultures at two temperatures of 25°C and 30°C. Each treatment is the means value of 5 replications with standard deviation.

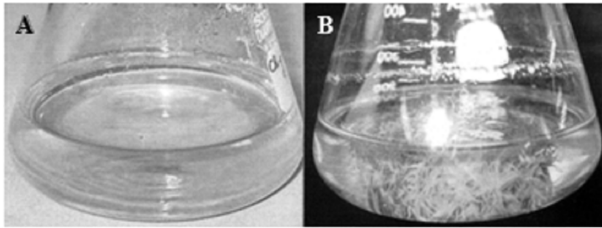


Fig. 2. The sesame root cultures treated with and without NAA. No root growth was observed in NAA untreated culture (A), but its active growth was identified in NAA treated culture (B).

참깨의 뿌리생장에 미치는 질산은(AgNO₃)의 영향

질산은(AgNO₃)은 식물의 조직배양에서 식물뿌리나 식물 세포의 성장을 촉진하거나 혹은 어떤 특정 물질의 생산을 유도하는 식물배양의 첨가제로 흔히 사용되고 있다[2]. 따라서 본 실험에서는 질산은이 참깨의 뿌리생장에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험이 수행되었다. 이 실험결과는 Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 0.5 mg/l의 질산은이 첨가된 처리구에서 참깨의 뿌리생장이 가장 높게 측정되었으며(8.8±0.2 g fresh weight), 25°C에서(8.1±0.2 g fresh weight) 배양된 처리구 보다는 30°C에서 배양된 뿌리의 생장이 약간 높게 나타났다(Fig. 3). 그리고 질산은의 농도가 0.5 mg/l 이상의 높은 농도에서는 뿌리의 생장이 오히려 감소되는 경향이 있었다(Fig. 3). 이러한 현상은 질산은의 첨가는 적절한 농도로 첨가하는 것이 참깨의 뿌리생장에 도움이 되지만 적정 농도 이상에서는 오히려 뿌리생장에 불리하다는 사실을 말해 주고 있다. 이러한 결과는 다른 식물의 뿌리배양에서도 보고되고 있을 뿐 아니라, 식물의 종류에 따라서도 질산은의 적정 농도가 서로 다르게 나타난다는 사실이 알려져 있다[8,14,15]. 이와 같이 식물의 뿌리배양에서 질산은의 영향에 대한 기작은 아직 정확하게 규명된 사실이 없지만 식물 생장조절제의 하나인 에틸렌의 합성에 질산은이 관여함으로써 뿌리의 생장에 간접적으로 영향을 미친다는

것이다. 예를 들면, 질산은의 적정 농도에서는 에틸렌의 합성이 체내에서 적절하게 조정되어 생체의 성장을 촉진시키지만 적정농도 이상에서는 에틸렌의 합성이 과도하게 합성되어 체내에 필요 이상의 에틸렌이 축적되어 오히려 생체의 성장을 저해시키는 효과가 나타나기 때문에 생체의 생장이 감소하게 된다는 것이다[16]. 이러한 이론적 배경은 본 실험의 결과에서도 잘 설명되고 있으며, 식물의 조직배양에서 흔히 질산은이 첨가되는 이유가 되고 있다.

HMF의 생산에 미치는 배양온도 및 NAA의 영향

Hydroxymethylfurfural (HMF)은 주로 화학적 반응공정으로 합성되어 왔지만 현재까지 식물 바이오촉매를 이용한 조직배양에 의해서 합성된 적이 없다. 따라서 본 실험에서 처음으로 시도되는 연구로서 친환경인 HMF의 합성 방법이 될 것이다. 앞서서도 언급된 바와 같이 참깨의 뿌리를 바이오촉매로 이용하여 HMF를 생산하기 위해서는 참깨의 뿌리생장 조건이 우선적으로 확보되어야 한다. 따라서 위에서 수행된 참깨의 뿌리생장 조건하에서 HMF의 합성을 유도하기 위해 앞의 실험에서 제시된 배양조건으로 HMF의 합성이 수행되었으며, HMF의 합성 여부를 확인하기 위해서 GC-mass 분석 실험이 수행되었고, HMF가 생산되고 있다는 사실이 확인되었다(Fig. 4). Fig. 5는 NAA의 농도가 HMF의 생산에 미치는 영향을 보여주고 있는 것으로서 전체적으로 볼 때 HMF의 합성은 NAA 무처리구를 제외하고는 거의 비슷한 수준의 HMF가 합성되었다는 사실을 알 수 있었다. 그리고 처리구 중에서 HMF합성(약 6,000 ppm)이 가장 높게 측정된 처리구는 배양온도 25°C에서 NAA 0.5 mg/l 농도로 배양된 처리구에서 측정된 반면에 NAA 무처리구에서는 HMF 합성이 가장 낮게 측정되었으며, HMF의 합성에는 두 배양온도에 의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 5). 이 실험결과와 앞의 실험결과를 종합해 볼 때 HMF의 합성은 뿌리의 생체생장에 의해서 직접적으로 영향을 받고

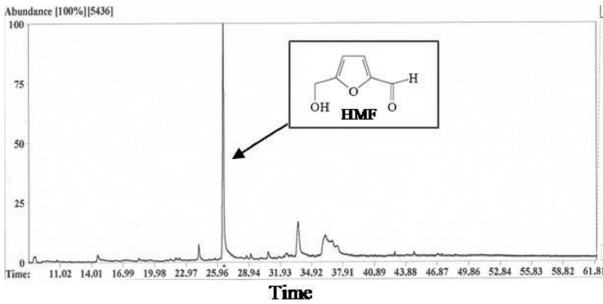


Fig. 4. The ion current chromatogram analyzed by GC-MS (gas chromatography-mass). The samples were prepared using the liquid medium cultured for 3 weeks. The synthesis of hydroxymethylfurfural (HMF) in the medium was identified (the peak indicated with an arrow).

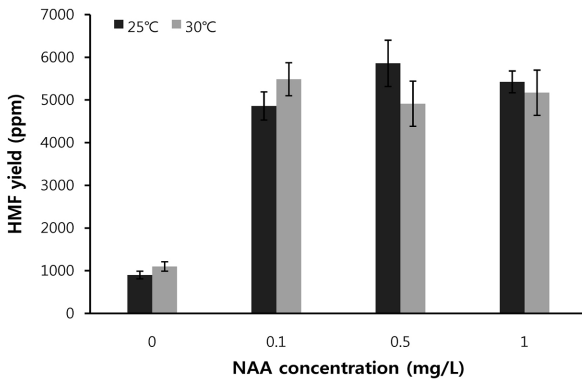


Fig. 5. Effect of NAA on the synthesis of hydroxymethylfurfural (HMF) produced by the flask cultures of sesame roots at two temperatures of 25°C and 30°C. Each treatment is the means value of 5 replications with standard deviation

있음을 시사해 주고 있을 뿐 아니라, 뿌리가 생체 바이오촉매로서의 기능을 가지고 있다는 사실을 뒷받침해 주고 있다는 사실을 시사해 주었다. 그리고 NAA의 농도는 뿌리의 생장에는 영향을 미치는 것으로 사료된 반면에 HMF의 합성에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었다. 일반적으로 생체 바이오촉매는 화학적 반응에서 어떤 반응물질의 특정 입체구조를 전환시키거나 혹은 다른 물질의 부산물을 최소화시키기 위하여 사용되는 촉매로서 주로 효소나 미생물이 바이오촉매로 사용되고 있으며, 이들을 반응물에 직접 첨가하거나 혹은 이들과의 공동배양을 통하여 목표 물질을 생산하기 때문에 이와 관련된 촉매 기능 뿐 아니라 반응 효율성이 높은 바이오촉매를 개발하기 위한 연구가 지속적으로 수행되어 왔다[4]. 특히 환경 친화적인 반응공정에서는 바이오촉매의 사용이 필수적이기 때문에 바이오촉매 기술은 앞으로도 계속 개발되어야 할 중요 연구 분야로 주목을 받고 있다. 따라서 본 실험에서 제시된 실험결과로 볼 때 식물뿌리도 바이오촉매로서 가능성이 높다는 사실을 보여주었으므로 보다 효율성이 개선된 식물 바이오촉매 기술을 개발하기 위한 연구는 앞으로도 계속되어

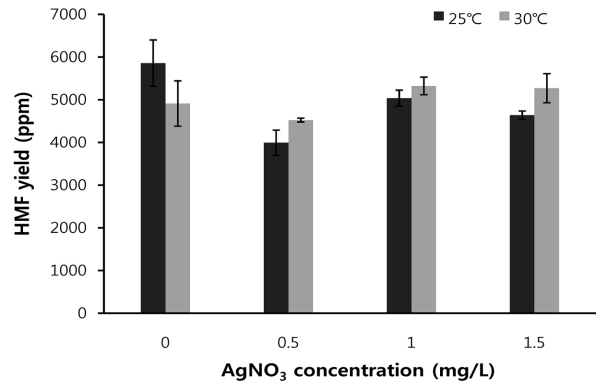


Fig. 6. Effect of silver nitrate (AgNO₃) on the synthesis of hydroxymethylfurfural (HMF) produced by the flask cultures of sesame roots at two temperatures of 25°C and 30°C. Each treatment is the means value of 5 replications with standard deviation.

야 할 것이다[3,5].

HMF의 생산에 미치는 질산은(AgNO₃)의 영향

질산은이 HMF의 합성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 참깨의 뿌리배양에 질산은을 네 부류의 농도(0.0 mg/l, 0.5 mg/l, 1.0 mg/l, 1.5 mg/l)로 나누어 첨가하였다. 예상과는 달리 질산은이 첨가된 처리된 구에서는 HMF의 합성이 오히려 억제되는 경향을 보여준 반면에 질산은이 첨가되지 않은 무처리구에서 HMF의 합성이 가장 높은 결과가 나타났다(Fig. 6). 질산은의 농도가 0.5, 1.0 및 1.5 mg/l로 처리된 구에서는 질산은 무처리구에 비해서 약 8-10% 정도의 HMF 합성이 감소되는 경향이 나타났으며, 두 배양 온도(25°C와 30°C 배양) 간에도 HMF의 합성에 차이가 보이지 않았다(Fig. 6). 이러한 결과로 판단하여 볼 때 질산은의 첨가는 HMF의 합성을 저해하는 것으로 추측되었으며, 이러한 HMF의 합성에 대한 질산은의 저해 현상은 다음의 두 이유 때문에 생긴 것으로 사료되었다. 첫 번째 이유는 질산은의 첨가에 의해서 배양뿌리에서 발생한 에틸렌의 영향으로 배양 중에 있는 참깨뿌리에 생리적 변화가 초래되어 참깨뿌리의 바이오촉매 기능과 연관된 뿌리의 생리적 기능이 저하되었거나 아니면 기능이 완전히 소멸되어 HMF의 합성이 촉진되지 못했기 때문에 일어난 결과로 추측되었다[16]. 질산은의 첨가에 의한 HMF의 합성 저해 현상에 대한 또 다른 이유는 질산은을 구성하고 있는 은이온 금속과 질산염 이온들이 배양되고 있는 참깨뿌리의 생체에 흡수되어 참깨뿌리의 바이오촉매 기능에 관련된 유전자의 발현을 억제시킴으로서 결과적으로 HMF의 합성이 저해된 것으로 생각되었다[13]. 따라서 참깨뿌리를 바이오촉매로 사용하여 HMF를 합성하기 위해서는 배양매지에 질산은을 첨가하지 않는 것이 효율적인 HMF 합성 방법이라는 중요한 실험적 증거 자료가 본 실험을 통하여 제시되었다.

요 약

참깨의 뿌리를 바이오촉매로 이용한 뿌리 배양을 통하여 HMF를 생산하기 위하여 뿌리의 성장과 HMF의 합성에 적합한 뿌리배양 조건을 탐색하였으며, 이를 위하여 NAA (naphthalene acetic acid), silver nitrate의 적정 농도조건 및 적정 배양온도 조건에 대한 실험이 수행되었다. 뿌리의 생장이 가장 높은 처리구는 30°C에서 NAA의 농도가 1.0 mg/l로 첨가된 처리구에서 측정되었으며, 평균적으로 볼 때 두 배양 온도(25°C와 30°C)간에는 뿌리의 성장차이는 측정되지 않았다. NAA가 첨가되지 않은 처리에서는 두 배양온도 모두에서 참깨의 뿌리생장이 전혀 생기지 않은 반면에, NAA가 첨가된 배양에서는 두 배양온도에서 뿌리의 생장이 확인되었다. 그리고 0.5 mg/l의 질산은이 첨가된 처리구에서 참깨의 뿌리생장이 가장 높게 측정되었으며, 25°C에서 배양된 처리구 보다는 30°C에서 배양된 뿌리의 생장이 약간 높게 나타났고, 질산은의 농도가 0.5 mg/l 이상의 높은 농도에서는 뿌리의 생장이 오히려 감소되는 경향이 있었다. 그리고 HMF의 합성의 경우 가장 높게 측정된 처리구는 배양온도 25°C에서 NAA 0.5 mg/l이 첨가된 처리구에서 측정된 반면에 NAA 무처리구에서는 HMF 합성이 측정되지 않았다. 질산은이 첨가된 처리구에서는 HMF의 합성이 오히려 억제되는 경향을 보여준 반면에 질산은의 무처리구에서 HMF의 합성이 가장 높은 결과가 나타났다. 질산은의 농도가 0.5, 1.0 및 1.5 mg/l로 처리된 구에서는 질산은 무처리구에 비해서 약 8-10% 정도의 HMF 합성이 감소되는 경향이 나타났으며, 두 배양 온도(25°C와 30°C 배양) 간에도 HMF의 합성에는 차이가 보이지 않았다.

감사의 글

본 연구는 동아대학교에서 지원하는 동아대학교 학술연구비의 지원에 의해서 수행되었다.

References

- Abdulmalik, O., M. K. Safo, Q. Chen, J. Yang, C. Brugnara, K. Ohene-Frempong, D. J. Abraham, and T. Asakura. 2005. 5-hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *British J. Haematol.* **128**, 552-561.
- Chun, J.-A., W.-H. Lee, M.-K. Han, J.-W. Lee, Y.-B. Yi, G.-Y. Park, and C.-H. Chung. 2007. Optimization of abiotic factors for improved growth and extracellular production of recombinant fungal phytase in sesame hairy root cultures. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **12**, 242-249.
- Comassetto, J. V., A. T. Omori, Á. L. M. Porto, and L. H. Andrade. 2004. Preparation of chiral organochalcogeno- α -methylbenzyl alcohols via biocatalysis. The role of *Daucus carota* root. *Tetrahedron Lett.* **45**, 473-476.
- Faber, K. 2000. Biotransformation in organic chemistry, 4th eds., Springer-Verlag, Berlin.
- Giri, A., V. Dhingra, C. C. Giri, A. Singh, O. P. Ward, and M. L. Narasu. 2001. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnol. Advances* **19**, 175-199.
- Jin, U. H., J. A. Chun, M. O. Han, J. W. Lee, Y. B. Yi, S. W. Lee, and C. H. Chung. 2005. Sesame hairy root cultures for extra-cellular production of a recombinant fungal phytase. *Process Biochem.* **40**, 3754-3762.
- Lewkowski, J. 2001. Synthesis, chemistry, and applications of 5-hydroxymethyl-furfural and its derivatives. ARKIVOC, 1, (ARKAT-USA; ISSN1424-6376), pp. 17-54. (Website; www.arkat-usa.org/home.aspx?VIEW-MANUSCRIPT&MSID=403).
- Naik, S. K. and P. K. Chand. 2003. Silver nitrate and aminethoxyvinylglycine promote *in vitro* adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). *J. Plant Physiol.* **160**, 423-430.
- Prince, C. L., V. Bringi, and M. L. Shuler. 1991. Convection mass transfer in large porous biocatalysts: Plant organ cultures. *Biotechnol. Prog.* **7**, 195-199.
- Román-Leshkov, Y., J. N. Chheda, and J. A. Dumesic. 2006. Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose. *Science* **312**, 1933-1937.
- Román-Leshkov, Y., C. J. Barrett, Z. Y. Liu, and J. A. Dumesic. 2007. Production of dimethylfuran for liquid fuels from biomass-derived carbohydrates. *Nature* **447**, 982-986.
- Sharma, V. K., J. Choi, N. Sharma, M. Choi, and S.-Y. Seo. 2004. *In vitro* anti-tyrosinase activity of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural isolated from *Dichyophora indusiata*. *Phytotherapy Res.* **18**, 841-844.
- Tang, W., X. Luo, and V. Samuels. 2004. Regulated gene expression with promoters responding to inducers. *Plant Sci.* **166**, 827-834.
- Zhang, C.-H., J.-Y. Wu, and G.-Y. He. 2002. Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclotaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 396-402.
- Zhang, C.-H. and J.-Y. Wu. 2003. Ethylene inhibitors enhance elicitor-induced paclotaxel production suspension cultures of *Taxus* spp. Cells. *Enzyme Microbial Technol.* **32**, 71-77.
- Zhao, J., L. C. Davis, and R. Verpoorte. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **23**, 283-333.
- Zhao, H., J. E. Holladay, H. Brown, and Z. C. Zhang. 2007. Metal chlorides in ionic liquid solvents convert sugars to 5-hydroxymethylfurfural. *Science* **316**, 1597-1600.