

꾸지뽕나무 (*Cudrania tricuspidata*) 세포배양에 의한 신규 Flavonoids 생산

최명석* · 광상수 · 유장렬 · 이인경¹ · 유익동¹

경상대학교 산림과학부, 한국생명공학연구원 ¹식물세포공학연구소, ²항생물질연구소

Production of Novel Flavonoids in Cell Cultures of *Cudrania tricuspidata*

CHOI, Myung-Suk* · KWAK, Sang-Soo · LIU, Jang-Ryol · LEE, In-Kyung¹ · YOO, Ick-Dong¹

Division of Forest Science, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea

¹Plant Cell Biotechnology Lab., ²Antibiotics Research Lab., Korera Research Institute of Bioscience and
Biotechnology (KRIBB), Oun-dong 52, Yusung, Taejon, 305-606, Korea

ABSTRACT To produce novel bioactive flavonoids, Gericudranin A and Gericudranin B, a cell culture system of *Cudrania tricuspidata* including callus induction and optimization of culture conditions was established. Friable calli were efficiently induced from the hypocotyl segments of seedlings on B5 medium supplemented with 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L kinetin and 3% sucrose. Several factors were optimized for the Gericudranin production and the cell growth in suspension cultures. Low level of basal salt medium (1/8 MS), 1.0 mg/L IAA and 0.1 mg/L zeatin, and high level of sucrose (5%) were effective for the production of Gericudranins, whereas WPM with 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L zeatin, and 5% sucrose were more effective for the cell growth. When cells were cultured on MS liquid medium supplemented with 1.0 mg/L IBA, about 2200 µg/g dry wt of Gericudranin A could be produced. The level might be about 10 times of the native inner bark. About 2350 µg/g dry wt of Gericudranin B was also produced on MS liquid medium with 5% sucrose, 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L kinetin. The content was estimated about 3 times of the level of native inner bark.

Key words: Anticancer activity, cell cultures, *Cudrania tricuspidata*, gericudranin

서 론

꾸지뽕나무 (*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과에 속하는 낙엽성 소교목 또는 관목으로 한방에서는 부인봉증 (여성 허약증), 혈경화질 (부인병), 풍이허풍 (몸이 허약할 때 외사가 침입하여 나타나는 귀머거리 증상), 노부혈가 (중년여성의 자궁근종), 남자의 현벽민비 (남자의 협부의 종양), 노손허리 (탈진, 과로로 몸이 쓰러지는 경우), 요신냉 (요부 이하의

냉감) 등의 치료에 민간에서 이용되고 있다 (강소신의학원 1985).

Lee 등 (1996)은 꾸지뽕나무 식물체로부터 강한 항암활성을 나타내는 신규 flavonoid계 물질인 Gericudranin 물질을 분리하여 구조를 밝힌바 있으며 (Figure 1), 이 화합물은 간암, 대장암, 자궁암, 폐암, 신경계암 및 피부암 세포주에 강한 활성을 보고하였다. 한편 꾸지뽕나무는 중남부지방에 자생하고 있는 자원식물이나, 뛰어난 약효 때문에 민간에 의해 무차별적으로 남획되고 있어 보호가 시급한 실정이다. 또한 Gericudranin의 뛰어난 약리활성에도 불구하고 꾸지뽕나무에는 0.1% 미만의 적은 양이 함유되어 있어 신규 flavonoid의 안정적인 공급을 위해서는 모식물체를 대신할 새로운 생산법의

*Corresponding author. Tel 055-751-5493 Fax 055-753-6015
E-mail mschoi@nongae.gsnu.ac.kr

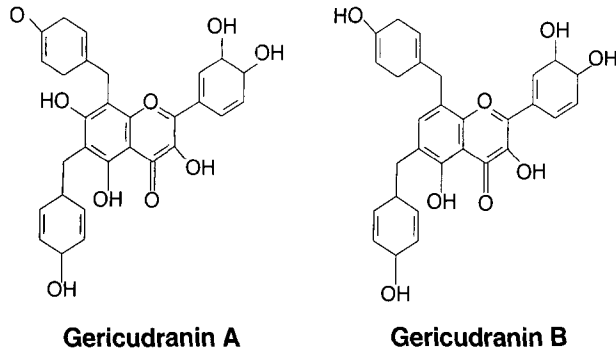


Figure 1. Structures of Gericudranin A and B.

개발이 필요하다.

한편 식물세포 배양은 질병, 강수량 등 환경의 지배를 받지 않고도 식물이 생산하는 유용 이차대사산물을 안정적으로 생산할 수 있는 장점이 있다. 식물세포 배양에 의한 유용물질의 상업적인 생산은 지치 (*Lithospermum erythrorhizon*)의 shikonin, 황련의 berberine 등 극소수에 불과하며, 최근에는 주목 (*Taxus spp.*) 나무 유래 함유제인 taxol 고생산 시스템을 국내 외에서 확립하여 이를 대량생산하고 있다 (Buitelaar and Tramper 1992; Sohn and Okos 1998). 세포배양을 통한 산업화의 저해요인은 개발된 배양세포의 생산성이 식물체에 비해 낮거나 대량배양의 어려움 등을 들 수 있다. 따라서 지속적인 고생산성 세포주의 선발과 배지, 성장조절제 등과 같은 적정 배양조건 구명에 관한 연구가 요구된다 (Misawa and Nakanishio 1988).

세포 배양은 알칼로이드, 정유, 페놀 등 식물이 생산하는 모든 이차대사산물 생산이 가능하며, flavonoid의 생산은 감초 (*Glycyrrhiza uralensis*)의 echinatin (Kobayashi et al. 1985), *Solanium jasminoides*의 quercetin과 kaempferol (Jain and Sahoo 1982), 강낭콩 (*Phaseolus vulgaris*)의 phaseollin (Dixon and Fuller 1976), *Pueraria lobata*의 coumestrol (Takeya and Itokawa 1982) 등이 있다. 그러나 활발한 연구에도 불구하고 유용 자원식물인 꾸지뽕나무에 대한 연구는 없는 실정이다. 본 연구에서는 꾸지뽕나무의 세포 배양을 통하여 신규 생리활성물질인 Gericudranin의 안정적인 공급을 위한 기초자료를 마련하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

캘러스 유도 및 배양

지리산에서 채집한 꾸지뽕나무 (*Cudrania tricuspidata*) 종자를 70% 에탄올 용액에 1분간 침지한 후 1% 차아염소산나트륨 용액에 10분간 소독하고 멸균수로 수세하였다. 표면살균된 종자의 배를 적출한 후 성장조절제를 함유하지 않은 MS

기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 치상하여 무균발아시켰다. 무균식물체의 상배축, 뿌리, 배, 엽병조직을 메스로 나눠 2,4-D와 NAA, NAA와 kinetin 등이 혼합된 B5배지 (Gamborg et al. 1968)에 2주간 배양하여 캘러스 유도율과 성장률을 조사하였다. 캘러스는 동일배지에 2~3주마다 유연하고 생장이 왕성한 캘러스를 계대배양하였다.

고생산성 세포주 선발

각 조직별로 유도된 캘러스 1 g를 잘게 부수어 MS고체배지 20 mL이 들어 있는 100 mL 삼각플라스크에 넣고 25°C, 암상태에서 4주간 배양하여 세포생장률과 Gericudranin의 함량을 조사하였다. 일차적으로 선발된 캘러스를 잘게 부순 후, 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L kinetin을 함유한 MS액체배지에서 25°C, 100 rpm으로 3주간 배양한 후 각 처리구별로 세포생장률과 Gericudranin의 함량을 조사하였다. 세포생장률은 배양 3주 후 캘러스와 현탁 배양세포를 60°C 건조기에서 24시간 건조한 후 건조량을 측정하였다.

현탁 배양

세포 현탁배양은 배축 유래 세포주인 H2 캘러스 1 g를 잘게 부수어 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L kinetin을 함유한 1/2MS 액체배지에서 넣은 후 25°C, 100 rpm으로 4주간 배양

Table 1. Production of Gericudranin A and B in the callus induced from various explants of *C. tricuspidata* seedlings*.

Explants/Cell lines	Gericudranin ($\mu\text{g/g}$ dry wt)	
	A	B
Hypocotyl¹		
H1	170	300
H2	400	1,750
H6	170	1,000
H8	700	980
H12	100	500
Root²		
R1	100	400
R1	400	500
R3	1,000	1,000
R5	100	500
Petiole³		
P1	0	300
P2	800	1,000
P3	800	1,000
P4	300	900
P5	970	1,000
Intact bark (Mt. Jiri)	200	800

*All explants were cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L kinetin, and 3% sucrose.

¹Excellent cell growth with friable cell type.

²Relatively good cell growth with brownish cell type.

³Poor cell growth with compact cell type.

하였다. 세포가 응집하여 증식이 되지 않은 문제점이 발생하여 이를 해결하기 위해 Table 1에서 언급한 callus 세포주를 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L kinetin이 함유된 1/2MS 배지 20 mL에 세포 1g을 잘게 부순 후 넣고 100 rpm의 속도로 배양하여 현탁배양 가능 세포주를 선별하였다. 배양배지의 영향을 조사하기 위해 MS 기본배지의 무기염류의 농도를 1/8, 1/4, 1/2, 2, 4배로 조절하였고, WPM (Lloyd and McCown 1980), SH배지 (Schenk and Hilbrandt 1972), B5배지에서 세포생장율과 물질생산능을 조사하였다. 성장조절제의 영향을 구명하기 위하여 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L kinetin이 첨가된 1/8 MS배지에 배양된 세포를 옥옥신과 사이토키닌을 조합한 1/8MS배지에 4주간 배양한 후 세포의 성장과 Gericudranin A, B의 함량을 조사하였다. Sucrose의 영향을 조사하기 위하여 현탁배양 세포를 모아 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L zeatin을 함유한 1/8MS배지에 여러 농도의 sucrose를 첨가하여 4주간 배양한 후 세포의 성장과 Gericudranin의 함량을 조사하였다. 세포의 생장은 세포배양액을 Watmann No. 2 여과지로 여과한다음 세포를 분리하였고, 세포를 50°C 건조기에서 24시간 건조한 후 무게를 측정하였다.

Gericudranin 함량 분석

Gericudranin의 함량은 켈러스 1 g을 메탄올 용액이 든 막자사발에서 분쇄한 다음 sonicator에서 1시간 동안 추출하였다. 추출액에 2 N HCl이 든 용액을 가하여 100°C에서 1시간 가수분해하여 조추출액을 얻고, 50°C에서 감압건조하였다. 조추출액을 1 mL HPLC급 메탄올을 가하여 녹여낸 후 0.2 μm prefilter를 통과시켜 HPLC 함량 분석에 사용하였다. HPLC 분석은 Lichroprep RP-18 column (4.6×150 mm, 6 μm)이 장착된 HPLC 시스템 (Spectra Physics SP8800)에 acetonitrile과 water (28 : 72)의 이동상, 1.0 mL/min 유속으로 하였으며, 검출은 290 nm UV detector를 사용하였다. 분석조건에서 Gericudranin A와 B의 retention time는 각각 10.1분과 16.8분이었다. Gericudranin A와 B의 정량분석을 위해 각각의 표준물질 (10~1000 rpm)을 메탄올에 녹인 후 HPLC 분석을 행하고, 검량선을 작성하였다. 이때 Gericudranin A와 B의 correlation coefficient (r)은 각각 0.99였으며, 3반복에 대한 편차는 ±0.001%였다. Gericudranin의 확인은 retention time 및 표준물질과의 co-chromatography로 행하였다.

결과 및 고찰

켈러스 유도 및 증식

기내배양된 꾸지뽕나무의 각 부위로부터 배양 2주 후부터 켈러스가 유도되기 시작하였으며, 유도율은 부위마다 다소의

차이를 보였다. 켈러스 유도에 가장 좋은 부위는 배측부위로 나타났으며, 켈러스의 성장도 배측 부위가 가장 좋았다 (Figure 2). 켈러스의 형태 역시 다소 차이를 보였는데 배측으로부터 유도된 켈러스는 연노랑색의 friable한 형태를 보였으나, 엽병에서 유래한 켈러스는 단단한 양상을 보였다. 뿌리에서 유도한 켈러스는 암갈색을 띄었으며, 생장이 좋지 않았다. 꾸지뽕나무의 켈러스 유도를 위한 성장조절제로는 2,4-D 처리구보다는 NAA 처리구가 좋았다. 켈러스 유도에 가장 좋았던 처리구는 1.0 mg/L NAA로 90% 이상의 유도율을 보였으며, 기타 처리구에서도 60% 이상의 양호한 유도율을 보였다.

고생산성 세포주 선별

Gericudranin은 ODS column을 사용한 HPLC 분리조건에서 양호하게 분리되었으며 (Figure 3), Gericudranin의 함량

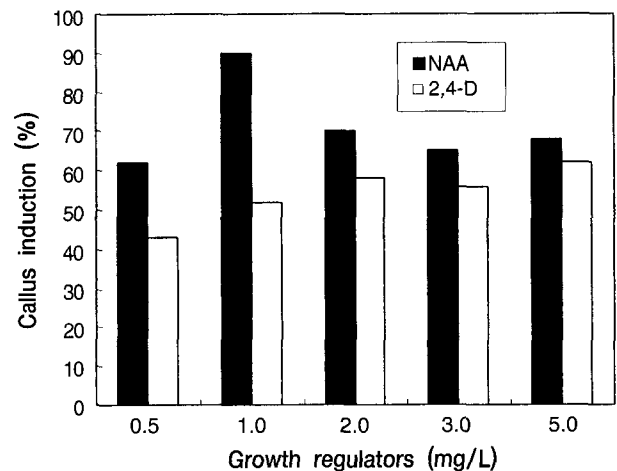


Figure 2. Effect of 2,4-D and NAA on callus induction from hypocotyl of *C. tricuspidata*. Hypocotyl tissues were cultured in B5 medium supplemented with various growth regulators, and 3% sucrose.

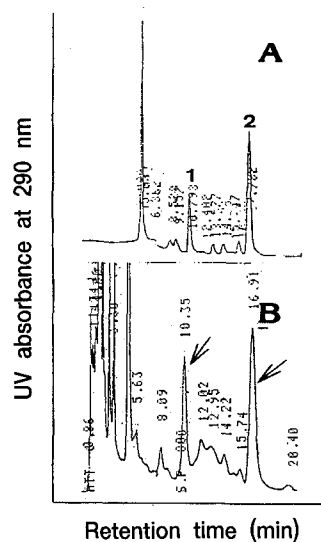


Figure 3. Typical HPLC chromatogram of crude extracts from cultured cells of *C. tricuspidata*. A: authentic Gericudranins (1; Gericudranin B, 2; Gericudranin A), B: cultured cell extracts.

은 각 세포주마다 다양하였다 (Table 1). 대부분 세포주에서 Gericudranin을 생산하였지만, 배축 유래 세포주 (H2)는 Gericudranin A를 g 건물중 당 400 µg으로 지리산에서 채집한 꾸지뽕나무 수피에 비해 2배, Gericudranin B물질은 g 건물중 당 1750 µg으로 2.2배 이상을 생산하였다. 또한 뿌리에서 유래한 R3 세포주는 Gericudranin A와 B물질은 g 건물중 각각 1000 µg으로 모식물체 수피에 비해 각각 5배와 1.2배를 생산하였다. 그러나 R3 세포주는 Gericudranin 고생산성 세포주이지만 세포의 생장이 좋지 않았다. 엽병 유래 캘러스는 단단하여 생장은 좋지 않았으나 물질 생산성은 비교적 좋았다.

세포 현탁배양

꾸지뽕나무 세포는 캘러스 유도는 잘되는 편이나 현탁배양에서는 세포들간의 강한 응집현상 때문에 생장이 매우 낮았다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 배축, 뿌리, 엽병 등에서 유래한 모든 세포주를 대상으로 현탁배양이 가능한 3개의 세포주를 재선발하였다 (Table 2). SF-1세포주는 배축 유래 세포주로 생장 및 물질 생산성이 타 세포주에 비해 가장 좋았다. SF-2 세포주는 뿌리 유래 세포주로 짙은 노랑색으로 세포생장률과 물질 생산성이 낮았다. SF-7은 배축 유래 세포주로 연노랑색을 띄며 세포생장이 가장 좋았으며, Gericudranin A, B 생산율도 g 건물중 당 315 µg과 723 µg으로 가장 높았다.

현탁배양에 적합조건을 구명하기 위해 배양배지, 당, 생장조절제 등을 조사하였다. Table 3은 Gericudranin 생산과 세포생장에 있어 배양배지의 영향을 본 것이다. 꾸지뽕나무 세포생장은 WPM배지에서 g 건물중 당 393 mg으로 가장 양호하였고, 그 다음으로 무기염 농도를 1/2 또는 1/4로 희석해준 MS배지가 각각 280 mg과 198 mg으로 높았다. 한편 Gericudranin 생산은 MS배지에서만 생산되었는데, 염농도를 1/8로 해주었을 때 g 건물중 당 Gericudranin A을 325 µg, Gericudranin B를 713 µg으로 생산이 가장 높았다. Gericudranin이 MS배지에서만 생산되는지에 관해서는 추후 연구가 요망

Table 2. Cell growth and Gericudranin production of selected 3 cell lines in suspension cultures of *C. tricuspidata* *.

Cell lines **	Morphology (cell color)	Dry weight *** (mg/flask)	Gericudranin content (µg/g dry wt)	
			A	B
SF-1	yellow	125.4	225	601
SF-2	deep yellow	106.4	100	116
SF-7	pale yellow	147.0	315	723

* All cell lines were cultured on 1/2 MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L kinetin, and 3% sucrose.

** SF-1 and SF-7 cell lines selected from hypocotyl derived callus, and SF-2 cell line also selected from root derived callus.

*** Fresh cells (1 g) inoculated to culture media, and then measured to dry weight after 4 weeks in culture.

된다. 식물세포 배양에 있어 배지는 세포생장뿐 아니라 물질 생산에 매우 중요하다 (Dougall 1980). 일반적으로 질소원, 인산염 등을 증가시키면 세포의 생장을 촉진하는 것으로 알려져 있지만, 물질 생산에는 오히려 나쁜 영향을 초래하는 것이 일반적이다. 본 연구에서도 세포의 생장과 물질 생산에 적합한 배지는 다른 것으로 나타났다. Zenk 등 (1977)은 *Catharanthus roseus* 세포배양에서 생장도모를 위해 사용한 여러 종류의 배지는 알칼로이드 생산 배지와는 달랐다고 한 바 있다.

Table 4는 꾸지뽕나무 세포생장과 Gericudranin 생산에 미치는 생장조절제의 영향을 본 것이다. 꾸지뽕나무 세포생장에 적합한 생장조절제는 2,4-D보다 NAA로 나타났다. NAA 처리구도 사이토키닌 조합에 따라서 각기 다른 생장을 보였으며, 0.1 mg/L 2ip 처리구에서 flask 당 215 mg으로 가장 좋은 생장을 보였다. 또한 2,4-D와 cytokinin 처리구간에서도 각기 다른 세포생장을 보였는데, 그 중 0.1 mg/L BA처리구와 혼용 처리구가 생장에 가장 좋았다. 순화된 배양체 및 oncogenic

Table 3. Effects of various culture media on the cell growth and Gericudranin production in suspension cultures of *C. tricuspidata* *.

Culture medium	Dry weight (mg/flask)	Gericudranin contents (µg/g dry wt)	
		A	B
1/8 MS	137	325	713
1/4 MS	198	154	442
1/2 MS	280	101	98
MS	128	69	78
2 MS	180	136	213
4 MS	50	104	423
WPM	393	ND**	ND
SH	57	ND	ND
B5	13	ND	ND

* Fresh cells (1 g) was cultured in various culture media supplemented with 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L kinetin, and 3% sucrose.

** Not detected on the basis of HPLC.

Table 4. Effects of growth regulators on cell growth and Gericudranin production in suspension cultures of *C. tricuspidata* *.

Growth regulators (mg/L)	Dry weight (mg/flask)	Gericudranin contents (µg/g dry wt)	
		A	B
1.0 NAA 0.1 BA	215	ND**	ND
1.0 NAA 0.1 2ip	287	ND	ND
1.0 NAA 0.1 kinetin	202	691	323
1.0 NAA 0.1 zeatin	276	256	635
1.0 2,4-D 0.1 BA	272	214	283
1.0 2,4-D 0.1 2ip	54	ND	ND
1.0 2,4-D 0.1 kinetin	159	ND	ND
1.0 2,4-D 0.1 zeatin	269	ND	ND
1.0 IBA	157	2200	1300

* Cells(1 g) were cultured in 1/2MS medium supplemented with various growth regulators, and 3% sucrose.

** Not detected on the basis of HPLC.

세포를 제외하고 식물배양에서는 성장조절제의 첨가가 필수적이다. 그간 식물배양에 의한 이차대사산물을 생산하는 데 있어 성장조절제 중 auxin에 대해 많은 연구가 이루어졌다. Kamimura와 Nishikawa (1976)는 Papaver 배양에서 IAA나 NAA 처리는 2,4-D에 비해 이차대사산물의 생합성을 촉진한다고 하였다. 또한 2,4-D는 많은 알칼로이드 전구체인 aspartate와 glutamate 생합성을 억제한다고 한 바 있다 (Kurz and Constabel 1979). 본 연구에서도 2,4-D 처리구보다는 NAA 처리구가 물질 생산량이 높아 앞의 보고와 일치하였다.

한편, Gericudranin A는 1.0 mg/L NAA과 0.1 mg/L kinetin^o 함유된 배지에서 g 건물중 당 691 μ g을, Gericudranin B는 1.0 mg/L NAA와 0.1 mg/L zeatin이 함유된 배지에서 g 건물중 당 630 μ g으로 가장 좋은 결과를 보였다. 1.0 mg/L IBA 단독처리구는 세포의 생장은 좋지 않았으나, 단위세포당 Gericudranin A와 Gericudranin B의 생산은 가장 높았다.

Figure 4는 Gericudranin 생산과 세포생장에 미치는 sucrose의 영향을 본 것이다. 꾸지뽕나무 세포생장에는 5% sucrose가 Gericudranin A의 생산에는 1% sucrose, Gericudranin B의 생산에는 5% sucrose 처리구에서 각각 g 건물중 당 1,505 μ g과 2,350 μ g으로 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 고농도의 sucrose가 유용물질 생산과 세포생장에 미치는 영향에 대한 연구는 지치에서 색소 생산 (Mizukami et al. 1978), 포플러에서 안토시아닌 생산 (Matsmoto et al. 1973), 황벽나무 (*Phellodendron amurense*)에서 berberine (Choi et al. 1996)이 있다.

세포배양을 이용한 유용물질 생산 연구가 1970년대부터 활발히 수행되었지만 산업화를 이룬 예는 드물다. 본 연구에서 개발된 꾸지뽕나무 배양세포는 항암작용 등 다양한 생리활성을 지닌 신규 flavonoid 물질을 대량생산하는데 시스템 개발을 위한 기초자료로 응용될 수 있을 것으로 생각된다. 향후 각종 elicitor를 이용한 생산성 향상연구, 대량배양조건의 구

명, Gericudranin의 생합성 및 대사공학 연구가 이루어질 필요가 있다.

적 요

꾸지뽕나무 (*Cudrania tricuspidata*)에 미량으로 함유되어 있는 신규 생리활성물질인 Gericudranin를 기내 배양세포에서 효율적으로 생산하는 시스템을 확립하기 위하여 켈러스 유도 및 여러 가지 배양조건 규명에 관한 실험을 수행하였다. 켈러스는 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L kinetin, 3% sucrose가 함유된 B5 배지에 배양된 배축에서 효율적으로 유도되었다. Gericudranin 생산과 세포생장에 관여하는 여러 가지 요인을 조사한 결과, 세포생장을 위해서는 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L zeatin과 5% sucrose가 함유된 WPM배지가 좋았고, Gericudranin 생산을 위해서는 무기염 농도가 1/8로 희석된 MS 배지, 1.0 mg/l NAA, 0.1 mg/l zeatin과 5% sucrose 처리구가 가장 좋았다. Gericudranin A의 함량 (2200 μ g/g dry wt)은 3% sucrose, 1.0 mg/L IBA가 함유된 1/2MS배지에서 모식물체의 수피의 함량보다 약 10배 높았으며, Gericudranin B의 함량 (2350 μ g/g dry wt)은 sucrose 5%를 함유한 1/2MS 배지에서 수피의 함량보다 약 3배 높았다.

인용문헌

Buitelaar RM, Tramper J (1992) Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. *J Biotech* 23:111-141

Choi MS, Shin DI, Park YG (1996) Berberine production by cell cultures of cork tree (*Phellodendron amurense* Rupr.). *Korean Pharmacog* 27:32-36

Dixon RA, Fuller KW (1976) Effects of synthetic auxin levels on phaseollin production and phenylalanine ammonialyase (PAL) activity in tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L. *Physiol Plant Pathol* 9:299-312

Dougall DK (1980) Nutrition and metabolism. *Plant Tissue Culture As a Source of Biochemicals* (Staba EJ ed.) pp. 21-58, Boca Raton, Florida, CRC Press

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158

Jain SC, Sahoo SL (1982) Falvonoids profile in *Solanium* species in vivo and in vitro. *Plant Tissue Culture* (Fujiwara A ed.), pp 353-354. Maruzen, Tokyo

Kamimura S, Nishikawa M (1976) Growth and alkaloid production of the cultured cells of *Papaver bracteatum*. *Agricult Biol Chem* 40:907-911

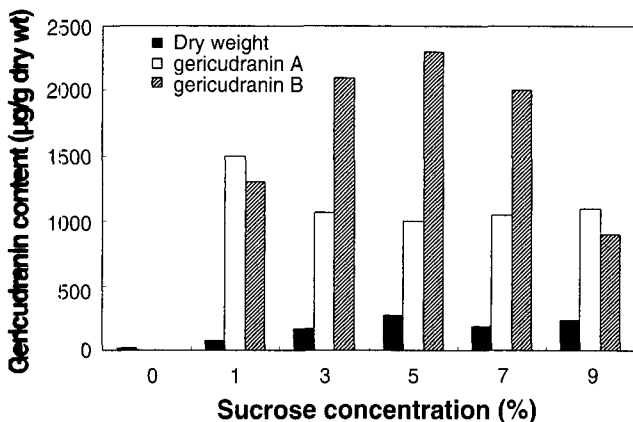


Figure 4. Effects of sucrose concentrations on cell growth and Gericudranin production from cell suspension cultures. All cultures were cultured on 1/2 MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA, 0.1 mg/L kinetin, and various concentration of sucrose.

강소신의학원 (1985) 중약대사전. 제2권. 소학판. p2383

Kobayashi M, Noguchi H, Sankara U (1985) Formation of chalcones and isoflavones by callus culture of *Glycyrrhiza uralensis* with different production patterns. *Chem Pharm Bull* **33**:3811-3816

Kurz WEW, Constabel F (1979) Plant cell cultures, a potential source of pharmaceuticals. *Advances in Appl Microbiol* **25**:209-240

Matsumoto T, Nishid K, Noguchi M, Tamaki E (1973) Some factors affecting the anthocyanin formation by *Populus* cells in suspension cultures. *Agri Biol Chem* **37**:561-567

Misawa M, Nakanishio TM (1988) Antitumor compounds; Production by plant cell culture. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants* (Bajaj YPS ed.), Vol. 4, pp. 199-207, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Mizukami H, Konoshima H, Tabada M (1978) Variation in pigment production in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. *Phytochem* **17**:95-97

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**:473-

497

Lee IK, Kim CJ, Song KS, Kim HM, Koshino H, Uramoto M, Yoo ID (1996) Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *Phytochem* **41**:213-216

Lloyd G, McCown BH (1980) Commercially feasible micropropagation of maountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot culture. *Comb Proc Int Plant Propagation Soc* **30**:421-427

Schenck RU, Hilbrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* **50**:199-204

Sohn HY, Okos MR (1998) Paclitaxel(Taxol): from nutt to drug. *J Microbiol Biotech* **8**(5):427-440

Takeya K, Itokawa H (1982) Isoflavonoids and the other constituents in callus tissues of *Pueraria lobata*. *Chem Pharm Bull* **30**:1496-1499

Zenk MH, El-Shagi H, Arens H, Stockigt J, Weiler EW, Deus B (1977) Formation of indole alkaloids, serpentine and ajmalicine in cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Applilation*, Barz W, Reinhard E, Zenk MH, eds) pp. 27-43. Springer-Verlag, Heidelberg, New York

(접수일자 2001년 4월 20일)