

## Yeast Extract로 처리된 *Eschscholtzia californica*의 Metabolite와 Protein의 변화

<sup>1</sup>조 화 영 · <sup>2</sup>박 정 진 · <sup>3</sup>윤 성 용 · † <sup>1,2</sup>박 중 문

<sup>1</sup>포항공과대학교 환경공학부, <sup>2</sup>포항공과대학교 화학공학과, <sup>3</sup>포항공과대학교 환경연구소  
(접수 : 2005. 3. 28., 게재승인 : 2005. 8. 14.)

### Profiling of Metabolites and Proteins from *Eschscholtzia californica* induced by Yeast Extract

Hwa-Young Cho<sup>1</sup>, Jeong-Jin Park<sup>2</sup>, Sung-Yong Yoon<sup>3</sup>, and Jong Moon Park<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>School of Environmental Science and Engineering, POSTECH, Pohang 790-170, Korea

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, POSTECH, Pohang 790-170, Korea

<sup>3</sup>Institute of Environment and Energy Technology, POSTECH, Pohang 790-170, Korea

(Received : 2005. 3. 28., Accepted : 2005. 8. 14.)

Benzophenanthridine alkaloids - sanguinarine, chelirubine, macarpine, and chelerythrine are produced from *Eschscholtzia californica* (California poppy, used as a sedative by Native Americans) and most of them are derived from dihydrosanguinarine. The properties of sanguinarine are the basis of its antimicrobial activity and its use in chemosurgery and skin cancer excision. For overproduction of sanguinarine from *E. californica*, yeast extract was used as elicitor and the elicited cell's metabolites were checked. Sanguinarine production was increased intracellularly about 8 times in the cell and 5 times extracellularly. We have performed proteomic analysis of proteins sequentially extracted from *E. californica* suspended cells which were cultured with elicitor, an increase of spot intensity was seen at 24 hours following elicitation. These proteins were separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE). We found several spots that were expected to be related to benzophenanthridine alkaloids production by comparing the production profiles of metabolites such as sanguinarine. These results demonstrate the use of metabolite analysis as a tool for detecting target proteins related to metabolites production pathway.

**Key Words** : *Eschscholtzia californica*, sanguinarine, two-dimensional electrophoresis

### 서 론

최근 식물세포를 미생물과 같은 방법으로 배양하여 식물세포의 이차 대사작용으로 생성되는 유용 물질을 생산하려는 추세가 두드러지고 있다(1). 그러나 대부분의 식물 세포배양은 epigenetic stability를 유지하기가 매우 어려워 세포배양방법을 이용한 이차대사산물의 생산성이 격감하는 사례가 보고 되고 있다(2). 따라서 현재까지의 이차대사산물 생산을 위한 세포배양은 전통적인 cell selection 방법에 의존하고 있는 실정이다.

식물체에 미생물의 침입으로 인해 생성되는 이차 대사산물

을 총칭하여 phytoalexin이라 한다. 이러한 phytoalexin의 축적은 식물체의 방어기작 중의 중요한 화학적 방어기작으로 pathogen유래의 화합물도 pathogen과 같이 식물체에 phytoalexin 축적을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 대부분의 phytoalexin은 항생제나 항암제로써의 역할을 하게 된다(3, 4).

식물체 유래의 sanguinarine 역시 benzophenanthridine alkaloids의 한 종류로 gram-positive bacteria에 대하여 강력한 살균 작용을 하는 천연물질(5-8)로 알려져 왔다. Fig. 1은 sanguinarine의 biosynthetic pathway를 보여준다. 이를 생산하는 식물은 *Sanguinaria canadensis*, *Macleaya cordata*, *Macleaya Microcarpa*, *Papaver somniferum*, *Eschscholtzia californica* (9-11) 등이며 이들은 오래 전부터, 백선 (버짐), 기관지염 등의 치료에 민간요법의 약용 식물로 사용되어 왔다. 1980년대에는 sanguinarine이 치주염을 일으키는 구강 내 미생물 제거에 효과적인 것으로 알려져 sanguinarine을 치약이나 구강세척제에 첨

† Corresponding Author : School of Environmental Science and Engineering, POSTECH, Pohang 790-170, Korea

Tel : +82-54-279-2275, Fax : +82-54-279-8437

E-mail : jmpark@postech.ac.kr

가하여 프라그 제거 및 생성을 억제하는 용도로 미국을 비롯한 여러 나라에서 사용되어 왔으며(12), 최근에는 곡물 보존제로도 사용되고 있다. 그 결과 sanguinarine은 매년 전 세계 수요량이 수 천 톤에 이르고 있으나, 낮은 수율과 추출방법, 자연적, 계절적 한계 등의 이유로 수요량의 10% 정도 밖에 공급하지 못하고 있다(13).

이에 따라 phytoalexin인 sanguinarine의 생산성을 증가시키기 위한 노력(14-16)이 다각도로 이루어지고 있다. 이들 중 sanguinarine의 생합성에 관련된 단백질의 발현 패턴을 연구하는 proteomics는 생합성 경로 내 bottleneck 과정을 밝혀내는데 효과적일 것으로 평가되며 이들 정보를 바탕으로 flux를 인위적으로 조절할 수 있을 것으로 기대된다(17).

따라서 본 연구에서는 yeast extract를 elicitor로 이용해서 sanguinarine의 생산성을 향상시키고 sanguinarine 생산과 직접적으로 관련된 protein을 분석하여 metabolite production과 protein과의 상관관계에 대해서 알아보려고 하였다.

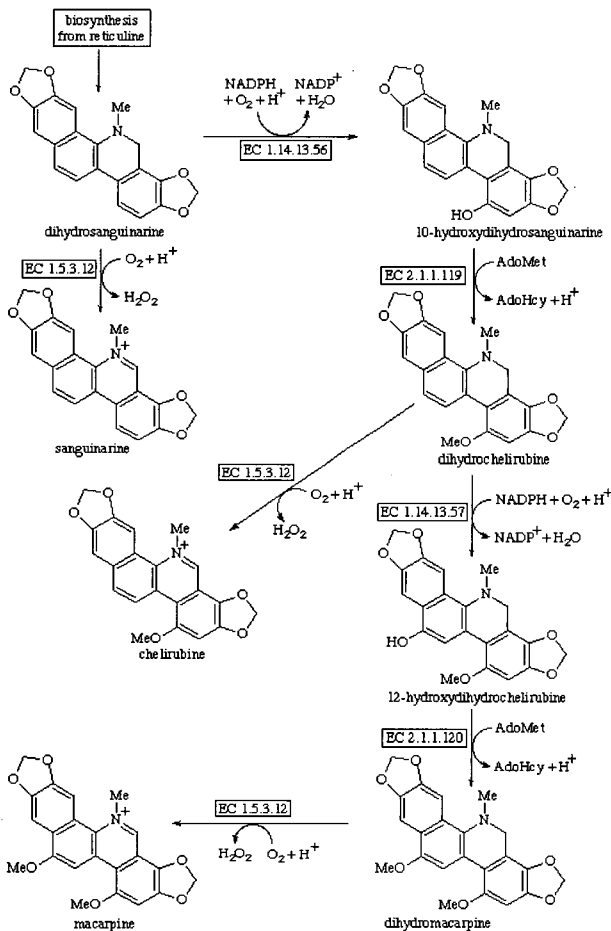


Figure 1. Sanguinarine biosynthetic pathway.

### 재료 및 방법

#### 실험재료 및 배양 조건

본 실험에 사용한 *Eschscholtzia californica*는 Murashige and Skoog's (MS) 고체 배지에서 16 h/8 h 광주기와 24°C 온도

조건에서 발아하였다. *Eschscholtzia californica*의 캘러스는 0.5 mg/L 1-naphthalenacetic acid 와 1.0 mg/L 6-benzylaminopurin 을 포함하는 MS 고체배지에서 키운 plantlet으로부터 얻었다. 유도된 캘러스는 plantlet과 같은 조건으로 16 h/8 h 광주기와 24°C 온도조건에서 4주마다 계대배양을 하였으며 현탁배양은 Linsmaier and Skoog (LS) 배지에서 0.4mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid와 0.1 mg/L 1-naphthalenacetic acid 호르몬 조건으로 16 h/8 h 광주기와 24°C 온도조건에서 2주마다 계대배양을 하였다. 모든 배지는 0.5 N HCl을 이용해서 pH 5.7로 조정 한 후 121°C에서 멸균 후 사용하였다.

#### Benzophenanthridine alkaloids의 분석 방법

분석은 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, Waters, USA)를 사용하였고, 분석 칼럼은 C<sub>18</sub> reverse phase column (3.9 mm× 300 mm; μBondapak, Waters)을 사용하였으며, 메탄올과 증류수를 gradient 조건으로 사용하였다. 증류수는 0.2% triethylamine을 첨가한 후 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 이용하여 pH 3.0으로 조정하였다. 유속은 1.0 mL/min로 유지하였고, 분석에 사용한 검출기는 photo-diode array detector (996, Waters, Milford, MS)를 사용하였으며 각 alkaloid는 283 nm에서 standard와의 지연시간 및 UV 흡광특성곡선을 비교하였다. Sanguinarine과 chelerythrine은 sigma로부터 구입하였으며, 다른 alkaloids는 분리나 반합성을 통하여 Mass Spectrograph(MS)로 확인하였다.

#### Elicitation

Yeast extract (Duchefa biochemie)를 증류수와 에탄올을 이용하여 정제한 후 수용성 성분만을 분말형태로 얻었다. 이를 elicitor 처리 전에 증류수에 용해시켜 사용하였다. Elicitor 처리 시기는 계대배양 7일후로 하였으며 elicitor 처리시 매년 세포의 fresh cell weight (FCW)를 측정 한 후 FCW 1 g당 5 mg의 elicitor를 처리하였다. 배양 중인 *Eschscholtzia californica* 현탁 세포에 elicitor를 처리하고 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48시간 후에 샘플링 하였다.

#### Protein extraction

세포 0.3 g을 1 ml extraction buffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 100 mM DTT, 4% CHAPS, 0.5% Carrier ampholyte, 40 mM tris, 0.002% Bromophenol Blue dye)에 넣고 sonicator를 이용하여 세포를 파쇄했다. 상등액을 얻기 위해 원심분리(15,000 ×g, 60 min, 4°C)를 시키고, -20°C에서 보관했다. 단백질 정량은 Bradford method를 이용했다.

#### Two-dimensional electrophoresis

Rehydration solution (7 M Urea, 2 M Thiourea, 100 mM DTT, 4% CHAPS, 0.5% Carrier ampholyte, 40 mM tris, 0.002% Bromophenol Blue dye)에 200 μg protein이 포함된 샘플을 총 450 μl가 되도록 strip holder에 로딩하고, 그 위에 dry strips (18 cm, pH 4-10 NL, Genomine Inc.)을 얹었다. IPGphor system (PROTEAN IEF Cell, Biorad)을 이용하여 Isoelectric Focusing (IEF)을 실시했으며 조건은 12 hr 동안 20°C를 유지하면서 rehydration을 한 후 250 V에서 15 min, 10000 V에서

30000 Vhr, 10000 V에서 60000 Vhr하여 총 90000 Vhr로 step-n-hold방법을 하였다. IEF가 끝나면 strip을 equilibration solution (6 M urea, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl [pH 8.8], 30% (v/v) glycerol, 0.002% bromophenol blue) 10 ml에 1차로 100 mg DTT를 넣고 10 min동안 shaking시킨 후 동일 양의 equilibration solution에 250 mg IAA을 넣고 10 min 동안 shaking시키면서 2차 equilibration을 진행하였다. 12%의 acrylamide homogenous gel을 만들고, 한 개의 gel 당 20 mA씩 6시간동안 로딩하였다. Gel은 0.1% Coomassie G250을 이용하여 staining하고, 4°C에 보관하였다. 그리고 gel pattern을 비교하기 위해서 PDQuest (Biorad)를 이용하였다.

**결과 및 고찰**

**Benzophenanthridine alkaloids의 분석**

메탄올과 물을 이용하여 sanguinarine, chelerythrine, chelirubine, dihydrosanguinarine, dihydrochelerythrine, 그리고 dihydrochelirubine을 분석하였다. Fig. 2는 이들의 HPLC분석 결과를 나타내고 있다. 11.7분에 sanguinarine, 13.0분에 chelerythrine, 14.5분에 chelirubine, 30.6분에 dihydrochelerythrine, 32.1분에 dihydrochelirubine, 33.7분에 dihydrosanguinarine이 매우 우수한 resolution을 나타내며 잘 분리되고 있음을 보여주고 있다. 본 분석결과와 standard 제품만을 이용한 sanguinarine, chelerythrine에 대한 분석 연구(18, 19)를 비교해 보면 본 연구실에서 분리 또는 합성으로 보유한 여러 alkaloid의 동시 분석은 기존에 보고 된 바가 없었다. Elicitor를 처리하지 않은 control 세포의 경우에는 dihydrobenzophenanthridine alkaloids인 dihydrochelirubine, dihydrochelerythrine, dihydrosanguinarine의 함량이 많은 반면 (Fig. 2 (A)), elicitor를 처리하였을 때는 dihydrobenzophenanthridine alkaloids의 농도가 줄고 산화된 형태인 benzophenanthridine alkaloids의 농도가 증가함을 HPLC로 확인할 수 있었다(Fig. 2 (B)). Elicitor를 처리하였을 때 sanguinarine의 생산량 증가에 관한 보고(14-16)는 많으나 dihydrobenzophenanthridine alkaloids와 benzophenanthridine alkaloid의 비교 결과는 처음이다.

**Metabolite의 변화**

Sanguinarine을 비롯한 benzophenanthridine alkaloid는 UV 아래에서 특정 형광색을 나타낸다(20). Sanguinarine은 오렌지색, dihydrosanguinarine은 푸른색, chelerythrine은 노란색 등 이러한 형광은 육안으로 세포내 metabolite의 유무나 그 성분의 변화를 쉽게 관찰할 수 있게 해준다. 시간이 지남에 따라 control에서는 큰 변화 없이 푸른색의 형광을 나타내었으나, elicitor로써 yeast extract를 처리한 샘플에서는 4시간이후부터 서서히 오렌지색 형광을 나타내면서 24시간 일 때 가장 밝은 오렌지색의 형광을 나타내었다(Fig. 3). Control에서는 큰 변화 없이 dihydrobenzophenanthridine alkaloid만을 생산하였으나 elicitor 처리시 sanguinarine을 포함한 benzophenanthridine alkaloid의 함량이 증가하였고, yeast extract가 elicitor로써 작용하는 것도 별도의 추가분석 없이 UV 조사시의 형광색 변화만으로도 쉽게 확인할 수

있었다. Yeast extract를 elicitor로 이용하여 sanguinarine의 생산량을 2배 이상 증가시킨 보고(21)는 기존 연구결과에 서도 확인할 수 있었다.

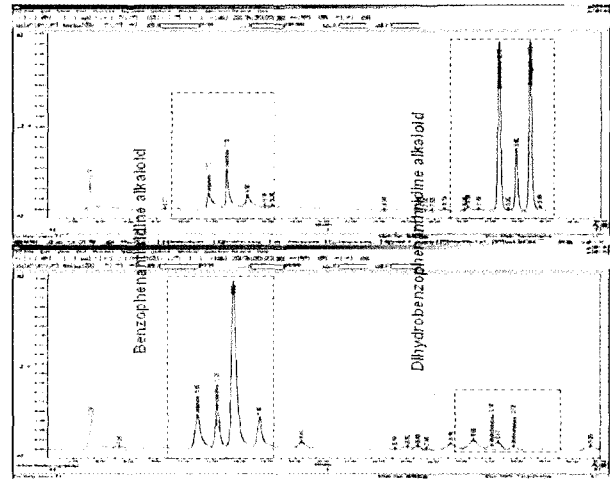


Figure 2. Representative HPLC showing the main benzophenanthridine alkaloid and dihydrobenzophenanthridine alkaloid of isolated from *Eschscholtzia californica* (elicitor untreated cell (A), elicitor treated cell (B)).

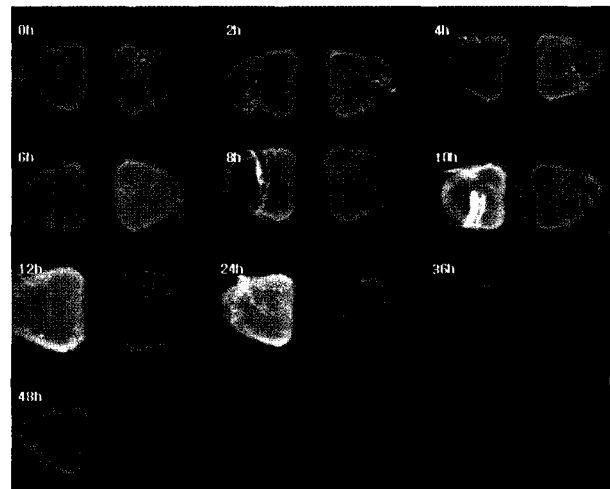


Figure 3. Time course of UV fluorescence from control and elicitor treated *Eschscholtzia californica* cell culture. Cell were treated with 5 mg/g FCW.

이후 시간이 지남에 따라 48시간에서는 형광이 사라지는 것을 관찰할 수 있었다. Chitin처리 후 12시간 후에 biomass의 감소를 나타내는 보고(22)와 같이 elicitor의 종류와 농도에 따라 차이는 있으나 일정시간이 지난 후에는 세포의 피사를 나타내는 것으로 판단된다.

Fig. 4는 시간에 따른 benzophenanthridine alkaloids의 세포내 농도의 변화를 보여준다. Sanguinarine, chelerythrine, 그리고 chelirubine의 세포내 함량이 1~1.5 mg/g DCW 생산되던 세포주에 yeast extract로 처리하였을 경우 시간이 지남에 따라 sanguinarine은 최대 8 mg/gDCW, chelirubine은 최대 4.5 mg/g DCW이 생산되었다. 이것은 일시적으로 증가한 후에 감소한 dihydrobenzophenanthridine alkaloids인

dihydrosanguinarine, dihydrochelerythrine, 그리고 dihydrochelirubine이 다음 단계의 산화된 화합물인 benzophenanthridine alkaloids로 전환되어 sanguinarine, chelerythrine, chelirubine이 증가된 것으로 보여진다(Fig. 4 (A), (B)). 이와 같은 결과는 control에서도 dihydrosanguinarine, dihydrochelerythrine, dihydrochelirubine은 시간이 지남에 따라 감소하는 경향이 나타났으나 elicitor로 처리하였을 경우에는 빠른 시간에 많은 감소를 하였다. Sanguinarine의 증가와 dihydrosanguinarine의 감소는 비슷한 양을 나타낸 반면 dihydrochelerythrine과 dihydrochelirubine의 감소한 양에 비해 chelerythrine, 그리고 chelirubine의 증가는 적은 양이었다. 이 역시 dihydrobenzophenanthridine alkaloids를 확보하지 못한 기존 연구에서는 찾아 볼 수 없는 결과였다.

반면에 배지에서는 yeast extract로 처리하였을 경우 36시간이 지난 후에 sanguinarine이 22 mg/L 방출되었으며 이것은 control인 4 mg/L의 sanguinarine이 나온 것에 비해 5배 이상이었다. 그 외 chelerythrine도 4배 이상, chelirubine은 3배 이상의 방출을 나타내었다(Fig. 4 (C), (D)). Yeast extract

의 공격을 받았을 때 생성되는 secondary metabolite 중 sanguinarine의 경우에는 세포 내부에 생산되는 양과 배지로 방출되는 양을 합하면 control에 비해 13배 이상의 생산을 보였으며 이는 pathogen의 공격을 받은 세포의 세포막이 파괴되고 이로 인해 생성된 metabolite가 배지로 방출됨을 의미했다. 이는 1998 Nahalka, J. et al의 보고에서와 같이 chitin을 elicitor로 이용하였을 때 세포 안에서 축적된 plumbagin이 세포의 용해로 인하여 배지로 방출된 현상과 일치한다고 판단된다(23).

**Protein의 변화**

Metabolite가 변화함에 따라 protein의 변화를 관찰하기 위해 two-dimensional electrophoresis (2-DE)를 이용하였다. Fig. 5는 yeast extract를 처리한 후 24시간 지난 뒤의 2D-PAGE image를 나타낸 것이다. PDQuest로 분석한 결과 control에서는 총 875개의 spots을, elicitor로 처리한 것은 총 1140개의 spots을 확인 할 수 있었으며 elicitor 처리시 spots이 전체적으로 더 진한 intensity를 나타내었다(Fig. 5). 이것

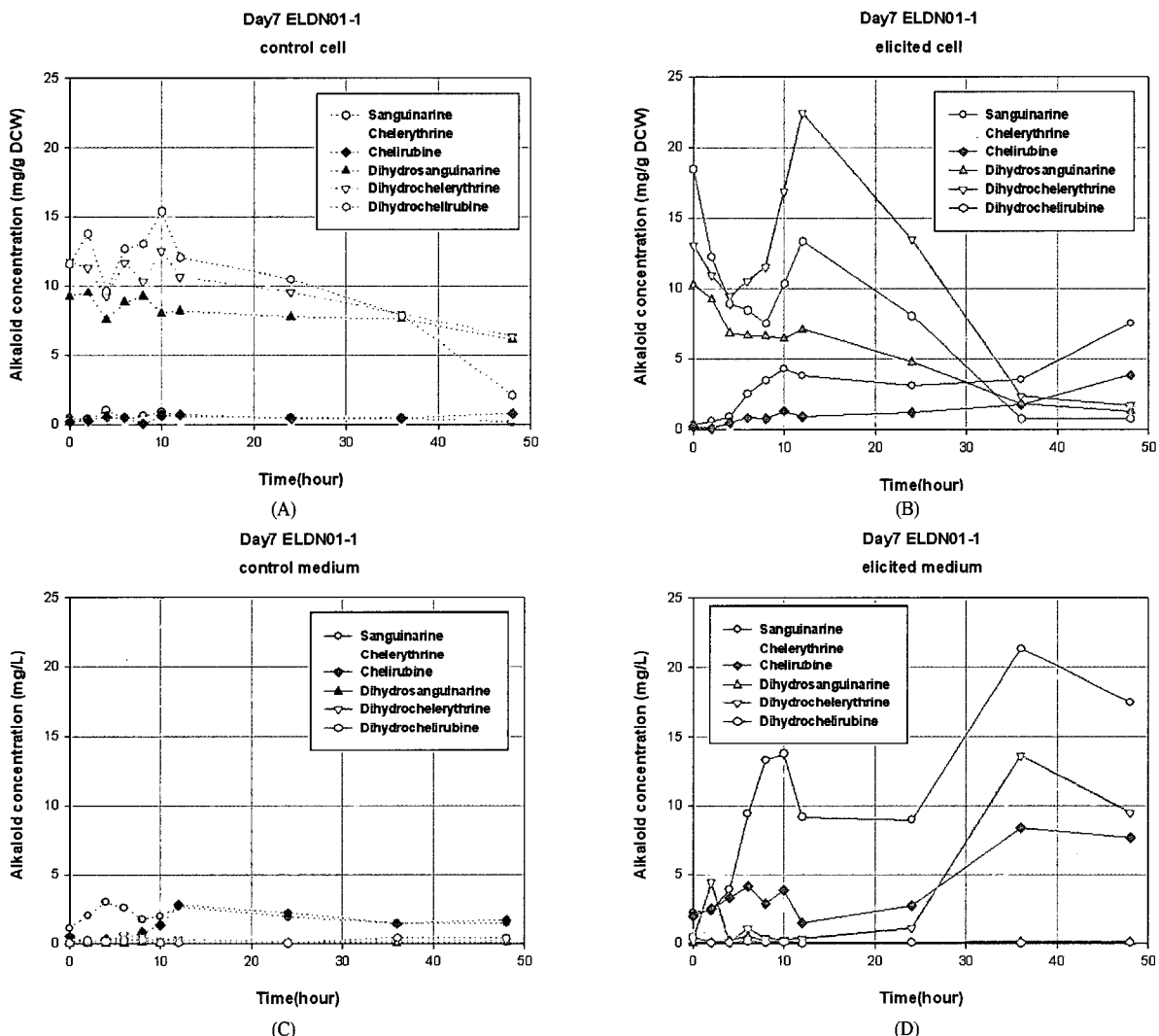


Figure 4. Effect on 5mg/g FCW yeast extract of *Eschscholtzia californica* (control cell (A), elicitor treated cell (B), control medium (C), elicitor treated medium (D)).

을 Fig. 6에 도식화하였다. 0시간일 때의 비교하여 24시간이 지난 뒤 spot이 control에서는 5%, 88%, 6.4%가 증가, 일정, 감소하였으며 elicitor로 처리하였을 경우엔 34%가 증가하였고, 39.4%가 일정하였으며 26.5%가 감소하였다. 이와 같이 protein의 발현 패턴이 elicitor에 따라 급격하게 변화를 보이는 phosphoprotein에 대한 선행된 연구가 있으며 그들에 의하면 protein의 phosphorylation은 elicitor에 대한 방어 신호 영향으로 발생되어 이러한 결과가 나타나는 것으로 보고(24)되고 있으나 본 연구내용과 같은 유용한 특정 alkaloid 생산과 연관된 protein은 아니었다. Elicitor 처리 시 증가하는 spot 34% 중 sanguinarine의 metabolite profile과 유사한 spot들이 있었으며 이것들은 sanguinarine을 생산하는데 관여하는 protein인 것으로 추정되었다.

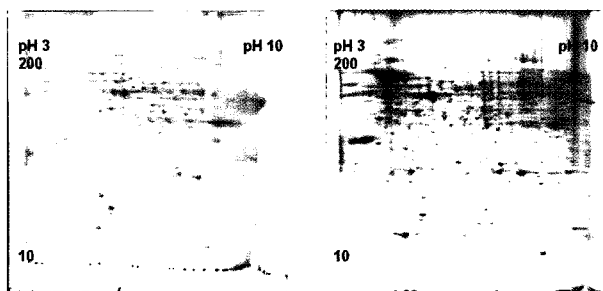


Figure 5. 2D-PAGE image from *Eschscholtzia californica*. cells treated with and without 5 mg/g FCW yeast extract elicitor at 24 hours (control cell at (A), elicitor treated cell (B)).

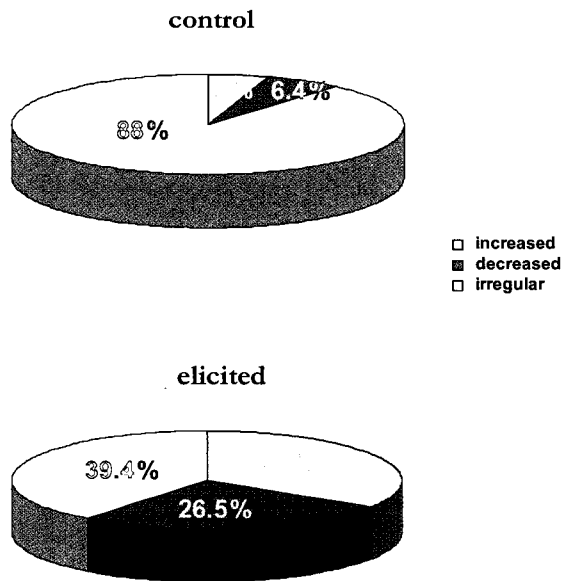


Figure 6. Comparison of the spots from *Eschscholtzia californica* (control cell (A), elicited treated cell (B)).

이와 같이 정제된 yeast extract 처리로 인해 sanguinarine의 과생산을 이룰 수 있었으며 새로이 생성된 protein과 과발현되는 protein을 확인할 수 있었다. 이렇게 선별된 protein은 동정을 통해서 어떠한 protein이 sanguinarine의 production에 관여하는지에 관한 실험을 진행 중에 있다.

## 요 약

Sanguinarine은 천연 항균성 물질로 의약품, 생활용품 그리고 화장품 등 그 이용은 다양하나 가격이 비싸고 수율이 따르지 못하는 점을 식물세포배양을 통하여 해결할 수 있을 것으로 기대된다. Sanguinarine의 생산을 극대화하기 위하여 전통적인 방법인 환경적 요인을 고려한 cell selection방법과 유전적 접근인 protein의 변화를 동시에 관찰하였다. Yeast extract를 elicitor로 이용하였을 경우엔 control에서는 관찰 할 수 없었던 sanguinarine에 해당하는 오렌지색의 형광을 볼 수 있었으며, 실제 metabolite의 분석에서도 sanguinarine의 증가를 확인 할 수 있었다. 세포 내부에서는 sanguinarine이 약 8배의 증가를 보였으며 배지에서는 약 5배의 증가를 보였다. Protein 역시 2-D electrophoresis로 확인한 결과 intensity가 5%, 88%, 6.4%의 증가, 일정, 감소를 보인 spot들이 elicitor 처리 후 세포에서는 34%, 39.4% 26.5%로 intensity가 증가된 spot들이 더 많이 검출되었다. 본 연구에서는 sanguinarine을 yeast extract를 이용해서 생산량을 증가시키고 sanguinarine의 생산과 관련된 protein의 변화에 대해서 알아보려고 하였다. 본 예와 같은 실험 연구방법이 식물이차대사산물 생산성에 관련된 protein군을 규명하는데 초석이 될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감 사

본 연구는 주식회사 포스코와 생명공학연구센터로부터 연구자금 (과제번호: 3PD0400401)을 지원받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Yun, E. J. (2002), Metabolic engineering of medicinal plants for tropane alkaloid production, *K. J. Plant Biotech.* **29**, 199-207.
2. Verpoorte, R., Heijden, R., and J. Memelink (2000), Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production, *Transgenic Res.* **9**, 323-343.
3. Romeo, R., S. Teresa, B. Christopher, and K. Tajalli (2003), Elicitation of plants and microbial cell systems, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**, 91-102.
4. Marcos, M., B. Gunter, and E. T. Palva (2003), Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants, *Mol. plant pathol.* **4**, 73-79.
5. Armaso, J. T., B. Guerin, M. M. Kraml., B. Mehta, R. Redmond, and J. C. Scaiano (1992), Phototoxic and Photochemical Properties of Sanguinarine, *Photochem. Photobio.* **55**, 35-38.
6. Facchini, P. J. and D. A. Bird (1998), Developmental Regulation of Benzylisoquinoline Alkaloid Biosynthesis in Opium Poppy Plants and Tissue Cultures In Vitro Cellular & Developmental Biology, *Plant* **34**, 69-79.
7. Blechert, S., W. Brodschelm, S. Holder, L. Kammerer, T. M. Kutchan, M. J. Mueller, Z. Xia, and M. H. Zenk (1995), The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4099-4105.
8. Dicosmo, F. and M. Misawa (1995), Plant, Cell and Tissue, Culture, Alternatives for Metabolite Production, *Biotechnol. Adv.* **13**, 425-453.
9. Samanani, N. and P. J. Facchini (2001), Isolation and partial characterization of norcoclaurine synthase, the first committed step in

- benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis, from opium poppy, *Planta* **213**, 898-906.
10. Bird, D. A. and P. J. Facchini (2001), Berberine bridge enzyme, a key branch-point enzyme in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis, contains a vacuolar sorting determinant, *Planta* **213**, 888-897.
  11. Park, S. U., Min Yu, and P. J. Facchini (2003), Modulation of berberine bridge enzyme levels in transgenic root culture on California poppy alters the accumulation of benzophenanthridine alkaloids, *Plant Molecular Bio.* **51**, 153-164.
  12. Archambault, J., R. D. Williams, C. Bedard, and C. Chavarie (1996), Production of sanguinarine by elicited plant cell culture I. shake flask suspension culture, *Biotech.* **46**, 95-105.
  13. <http://www.cheric.org/ippage/p/ippdata/2004/10/file/p200410-101.pdf>
  14. Archambault, J., R. D. Williams, M. Perrier, and C. Chavarie (1996), Production of Sanguinarine by Elicited Plant Cell Culture 3. Immobilized Bioreactor Cultures, *J. Biotechnol.* **46**, 121-129.
  15. Kumar, G. S., A. Das, and M. Maiti (1997), Photochemical Conversion of Sanguinarine to Oxysanguinarine. *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **111**, 51-56.
  16. Williams, R. D., N. Chauret, C. Bedard, and J. Archambault (1992), Effect of polymeric adsorbents on the production of sanguinarine by *Papaver somniferum* cell cultures, *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 971-977.
  17. Songstad, D. D., D. Epp, K. L. Giles, L. Friesen, I. Roewer, J. Park, and D. Novakovski (1989), Effect of Ethylene on Sanguinarine Production from *Papaver somniferum* Cell Cultures, *Plant Cell Reports* **8**, 463-466.
  18. Fei Z., C. Bo, L. Xu-Biao, Z. Xiao-Lan, and Y. Shou-Zhou (2004), Effect of mobile phase on loading mass for preparative separation of sanguinarine and chelerythrine on a reverse phase column, *J. Liq. Chromatogr. Technol.* **27**, 1491-1505.
  19. Marketa V., B. Petr, K. Vlastimil (2004), Capillary electrophoretic studies of acid-base properties of sanguinarine and chelerythrine alkaloids, *J. Chromatogr. A* **1040**, 141-145.
  20. Das, A., R. Nandi, and M. Maitl (1992), Photophysical property of sanguinarine in the excited singlet state, *Photochem. Photobiol.* **56**, 311-317.
  21. Byun S. Y., Y. W. Ryu, C. Kim, and H. Pedersen (1992), Elicitation of sanguinarine production in two-phase cultures of *Eschscholtzia californica*, *J. Ferment. and Bioeng.* **73**, 380-385.
  22. Williams, R. D., C. Bedard, C. Chavarie, and J. Archambault (1996), Production of sanguinarine by elicited plant cell II. Further nutrient aspects, *J. Biotechnol.* **46**, 107-120.
  23. Nahalka, J., J. Nahalkova, P. Gemeiner, and P. Blararik (1998), Elicitation of plumbagin by chitin and its release into the medium in *Drosophyllum lusitanicum* Link. suspension cultures, *Biotechnol. Lett.* **20**, 841-845.
  24. Scott C. R., S. N. Thomas, H. Daniel, I. Alejandro, M. Fred, and B. Thomas (2001), Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors, *The Plant Cell* **13**, 1467-1475.