

植物細胞 培養에 의한 二次代謝産物の 生成에 關한 研究

II. *Capsicum annuum* L.의 培養細胞에 있어서 Growth Regulator가 Capsaicinoids, Phenylpropanoids 生成 및 Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL) 活性에 미치는 영향

崔 奉 順

曉星女子大學校 食品營養學科
(1987년 2월 1일 접수)

Formation of Secondary Products by Plant Cell Culture

II. Effects of Growth Regulators on the Formation of Capsaicinoids, Phenylpropanoids and PAL Activity in Cultured Cell of *Capsicum annuum* L.

Bong-Soon Choi

Department of Food Science and Nutrition, Hyosung Women's University
(Received February. 1. 1987)

Abstract

In order to investigate the effects of growth regulators on the formation of capsaicinoids in callus of *Capsicum annuum* L., tissues were cultured in the Linsmaier and Skoog RM 1964 medium containing various growth regulators. Production of capsaicinoids during culture was monitored by gas chromatography.

In the presence of $10^{-6}M$ of 2,4-D and kinetin in the medium, 1182 μ g of capsaicinoids were formed per 100g dry wt. of tissue, of which was greater than with any of three other growth regulators. IAA, NAA, and kinetin of same concentrations had 65%, 38%, 68% effect of 2,4-D in capsaicinoids formation, respectively. Production of capsaicinoids increased gradually in the presence of 2,4-D as culture period was proceeded.

Of phenylpropanoids formed, cinnamic acid and coumaric acid were not significantly different in their levels, although growth regulators were varied. On the other hand, caffeic acid and ferulic acid formation were highest in the presence of 2,4-D. Effects of kinetin and IAA were about 70 percent of that of 2,4-D, whereas NAA had only about 30 percent effect.

Phenylalanine ammonia-lyase activity in cultured tissue was increased during the periods; 52, 81, and 209 μ moles of cinnamic acid per g fresh wt. were formed after 5, 15, and 25 days of culture, respectively.

緒 論

고추의 辛味成分은 Thresh에 依하여 分離, 結晶化되어 capsaicin이라 命名되었으며, Nelson과 Dawson¹⁾에 依해 化學構造는 N-(4-hydroxy-3-methoxy benzyl)-8-methylnona-trans-6-enamide로 밝혀졌다. 또한 Kosuge와 Furuta²⁾는 capsaicin과 dihydrocapsaicin을 發見하였으며, 最近에 capsaicin은 capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homodihydrocapsaicin 등의 5個 同族體가 存在함이 mass spectrometry,^{3,4)} gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)⁵⁾에 依해 밝혀졌으며, 이들을 總稱하여 capsaicinoids라 부르고 있다. 이들 同族體는 Figure 1에서 보는바와 같이 vanillylamine을 共通構造로 하여 여기에 結合된 分枝側 지방산의 탄소수의 長短 및 二重結合의 有無 등에 依해 그 構造를 달리하고 있다.

Capsaicinoids의 生合成에 關한 研究는 Bennet와 Kirby³⁾가 capsaicinoids의 vanillylamine 부분에 關하여, Leete와 Louden⁶⁾은 分枝側 지방산 부분의 生合成 經路에 關하여 報告하였다.

이러한 研究結果 capsaicinoids는 hydroxylated cinnamic acid로 부터 生成된 vanillylamine과 isobutyryl coenzyme A로 부터 生成된 9~11個 carbon의 分枝側 지방산이 結合하여 形成된 것이라고 믿었다.

培養細胞는 環境條件과 처리한 物質의 흡수가 容易하며 均일한 무균재료를 손쉽게 얻을 수 있는 利點이 있으므로⁷⁾ 高等植物의 代사 生理와 植物體가 가지는 잠재적인 物質 生成能力을 調査하여 그 生産性을 개발하기 위한 實驗材料로서 널리 利用되고 있다.

本 研究는 고추 培養細胞에 있어서 2,4-D, NAA, IAA 및 kinetin 등의 growth regulator가 capsaicinoid 生成에 미치는 영향과 중간대사산물인 cinnamic acid, coumaric acid 등의 phenylpropanoid 및 phenylalanine ammonia-lyase(PAL) 活性에 미치는 영향을 調査하였다.

材料 및 方法

1. Callus조직의 培養條件

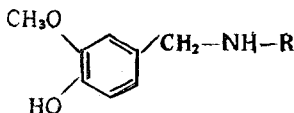
本 실험에 사용한 Callus 유도조건 및 培養液의 조제는 李, 崔^{8,10)}등이 行한 方法에 따라 行하였다. 즉, callus 培養 기본培地는 Linsmaier-Skoog RM 1964培地를 사용하였으며 여기에 kinetin 10⁻⁶M indole-3-acetic acid (IAA) 및 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)를 各各 10⁻⁶M 그리고 sucrose 3%, agar 1.5%을 첨가하여 使用하였다.

2. Capsaicinoids의 分離 및 定量

培養細胞(500g)를 건조한 후 Lee, 崔等^{9,10)}이 行한 方法에 따라 3배량의 acetone과 ethyl ether로 추출한 후 여과액을 減압, 농축하여 TLC 및 GLC 분석용 시료로 삼았다. Müller-Stock⁴⁾등의 方法에 의하여 capsaicinoids를 gas chromatography로 분석하였으며 그 조건은 Table 1과 같다.

3. Phenylpropanoids 및 phenylalanine ammonia-lyase activity 測定

1) Coumaric acid 측정은 Higuchi와 Shimada¹¹⁾의 方法에 따라 試料 callus 組織을 70% ethanol로 homogenize한 후 여과하여 減압 농축한 다음



- R = -CO(CH₂)₄-CH=CH-CH(CH₃)₂ : capsaicin
- = -CO(CH₂)₆-CH(CH₃)₂ : dihydrocapsaicin
- = -CO(CH₂)₅-CH(CH₃)₂ : nordihydrocapsaicin
- = -CO(CH₂)₅-CH=CH-CH(CH₃)₂ : homodihydrocapsaicin
- = -CO(CH₂)₇-CH(CH₃)₂ : homocapsaicin

Figure 1. Structure of capsaicinoids.

Table 1. Conditions of gas chromatography.

Instrument	: Shimadzu Model GC-5A gas chromatograph, equipped with a flame-ionization detector.
Column	: 3% silicon SE-30 on Chromosorb W(60-80 mesh, acid washed), coiled glass column (2m×3mm I.D.)
Temp. of column	: 230℃
Injection port	: 260℃
Detector temp.	: 260℃
Carrier gas	: N ₂ (40ml/min.)

paper chromatography에 의해 측정하였다. 전개 용매로는 toluene: acetic acid: water (4:1:5)을 사용하여 전개한 후 coumaric acid 부분을 절취하여 95% ethanol로 추출하여 310nm에서 O.D.를 측정하였다.

2) Caffeic acid는 Carter¹²⁾과 Afzalpurkar¹³⁾의 방법에 따라 95% ethanol로 추출 감압 농축하고 silicagel G plate에 spot 한 후 전개용매 n-butanol: acetic acid: water(4:1:5)로 전개하여 U.V. lamp로 확인한 후 320nm에서 O.D.를 측정하여 정량하였다.

3) Ferulic acid는 70% ethanol로 추출, 감압 농축하여 paper chromatography에 의해 측정하였다. 전개용매로는 chloroform: acetic acid (1:1)과 n-butanol: acetic acid: water (4:1:5)로 2次元 전개한 후 ferulic acid를 검출하여 Finkle과 Nelson,¹⁴⁾ Pickering¹⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다.

4) Cinnamic acid는 Koukol과 Conn¹⁶⁾의 방법에 따라 70% ethanol로 추출, 감압 농축한 후 2% acetic acid와 n-butanol: acetic acid: water (4:1:5)로 2次元 전개하여 cinnamic acid 부분을 검출하여 268nm에서 측정하였다.

5) Phenylalanine ammonialyase activity測定은 Koukol과 Conn¹⁶⁾의 방법에 따라 試料 callus組織을 cold acetone으로 마쇄한 후 여과하여 얻은 acetone dried powder 1g을 0.05M borate buffer (pH 8.0) 40ml로서 30℃에서 60分間 추출하여 효소용액으로 하였다.

上記 효소액 1ml와 0.05M borate buffer (pH 8.0) 2ml, 10⁻²M phenylalanine 1ml을 가하여 30℃에서 3시간 유지하였다. 여기에 6N HCl 0.1ml를 가하여 반응을 정지시킨후 生成된 cinnamic acid

을 ethyl ether 5ml을 가하여 충분히 혼합한 후 ether layer에 옮겨서 evaporation한 후 0.05M NaOH 4ml에 용해시켜 268nm에서 吸光度를 측정하였다. 同一條件에서 측정된 cinnamic acid 검량선에 의하여 그 함량을 산출하였으며 phenylalanine ammonia-lyase 活性 unit는 基質로부터 生成된 cinnamic acid mμ moles로 表示하였다.

結果 및 考察

1. Capsaicinoids 生成에 미치는 Growth regulators의 영향

植物 組織培養에 있어서 2차 대사산물의 生成은 植物成長 hormone의 종류나 농도에 따라서 달라진다고 報告되고 있다.^{17~19)} Capsaicinoids 生成에 미치는 2,4-D 및 growth regulators의 영향을 조사하기 위해서 培養 callus을 growth regulators 종류별로 처리한 培養基에 培養한 후 capsaicinoids의 生成에 미치는 2,4-D 및 growth regulators의 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 capsaicinoids의 生成은 Linsmaier-Skoog 기본배지에 kinetin 10⁻⁶M과 2,4-D 10⁻⁶M을 함유한 배지에 배양한 callus가 kinetin 10⁻⁶M과 NAA 10⁻⁶M을 함유한 배지에 배양한 것보다 capsaicinoids 含量이 약 2.4배 증가하였고 kinetin 10⁻⁶M과 IAA 10⁻⁶M을 함유한 培地와 kinetin 10⁻⁶M을 함유한 培地에서 보다 約 1.5배 증가하였다.

Growth regulators와 2차 대사산물의 生成과의 관계에 관한 보고를 調査해 보면 當근 培養細胞의 carotenoid 生成은 2,4-D 농도가 0.1ppm에서 10ppm으로 농도를 증가시키에 따라 증가되는 것

Table 2. Capsaicinoids content in *Capsicum annuum* L. callus tissue grown in Linsmaier and Skoog basal medium containing 10^{-6} M kinetin and 10^{-6} M various auxins at 28°C
(μ g/100g dry wt.)

Growth periods (days)	Growth regulators			
	K	KD	KN	KI
5	148	145	82	134
15	422	511	220	405
25	798	1,182	455	767

K : kinetin 10^{-6} M

KD: kinetin 10^{-6} M+2,4-D 10^{-6} M

KN: kinetin 10^{-6} M+NAA 10^{-6} M

KI : kinetin 10^{-6} M+IAA 10^{-6} M

으로 보고되고 있으며^{20,21)} *Stizolobium, hassjoa*의 조직배양에서는 Murashige-Skoog (1962) 배지에 2,4-D(1ppm)와 kinetin(0.1ppm)의 배지에서 DOPA가 생성되었다고 보고²²⁾되고 있다. 또한 *Symphytum officinale*의 조직배양에서는 glutamine의 생성은 2,4-D와 kinetin을 0.3mg/l 첨가한 배지에서 최대치를 나타내었으며²³⁾ *Cassia tora*의 anthraquinone 생성의 경우에는 10^{-7} M 2,4-D와 10^{-6} M kinetin에서 가장 함량이 높았다고 보고되고 있다.²⁴⁾

Callus 배양에 있어서 auxin류에 의한 2차 대사산물의 생성조절에 관한 연구를 보면 담배 배양세포의 경우¹⁷⁾ nicotine 생성에 미치는 영향은 IAA 배지에서培養한細胞는 nicotine을 생성하지만 2,4-D 배지에서培養한細胞는 생성되지 않았다.

이와 같이 2차대사 경로에 있어서 특수한 효소계가 auxin에 의해 제어된다는것이 報告되고 있다. *Capsicum annuum* L.의 경우에는 대사산물 생성과 세포성장이 비례하는 유형이며 growth regulator 중에서 2,4-D에 의해 callus의 成長 및 2차 대사산물의 生成이 촉진되었다. 이것은 capsaicinoids 生成經路에 關係한 효소들이나 중간생성물 生成에 2,4-D가 NAA나 IAA보다 효과가 큰 것으로 추정된다.

2. Phenylpropanoids 生成과 phenylalanine ammonia-lyase activity에 미치는 growth regulators의 影響

Capsaicin의 生成經路에 關한 報告를 보면 Leete

와 Loudon⁶, Bennett Kirby³⁾는 ¹⁴Clabel한 phenylalanine, tyrosine, coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid등을 투여한 실험을 한 結果 이들 각각이 capsaicin의 precursor가 될 수 있다고 報告하고 있다. 즉, phenylalanine은 deamination 되어 cinnamic acid, coumaric acid, caffeic acid 등 phenylpropanoid가 되고 이것은 CH₃기를 받아 ferulic acid가 된 후 다시 NH₃기를 받아 capsaicin의 vanillylamine部の 生合成에 關여한다고 報告되고 있다. capsaicinoids의 일부인 ten-carbon acid(8-methylnonanoic acid)部の 生合成에 關한 研究는 Leete와 Louden等⁶⁾ Fujiwake等²⁵⁾에 의하여 valine과 leucine이 Figure 2에서 보는바와 같은 경로를 거쳐 capsaicinoids가 生合成 됨이 확인되었다. 組織培養中에서 cinnamic acid와 그 誘導體 生成은 培養液中에 함유된 growth regulators의 종류에 따라 影響을 받는다고 알려져 있다.^{26,27)}

本 實驗에서는 capsaicinoids 전구물질로 알려진 cinnamic acid, coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid 生成에 미치는 growth regulators의 影響을 檢討하기 위하여 Linsmaier-Skoog basal medium에 몇 가지 growth regulators를 종류별로 함유한 培地에 callus을 培養 5, 15, 25日 後 生成한 대사 중간 生成物을 조사한 結果 Table 3에서 보는 바와 같은 結果를 얻었다.

Cinnamic acid, coumaric acid의 生成은 5, 15, 25日에 점진적으로 증가하였으며, 배양 25日 後 cinnamic acid 生成의 경우 kinetin, 2,4-D, NAA, IAA 培地에 각각 691, 755, 675, 682 μ g/

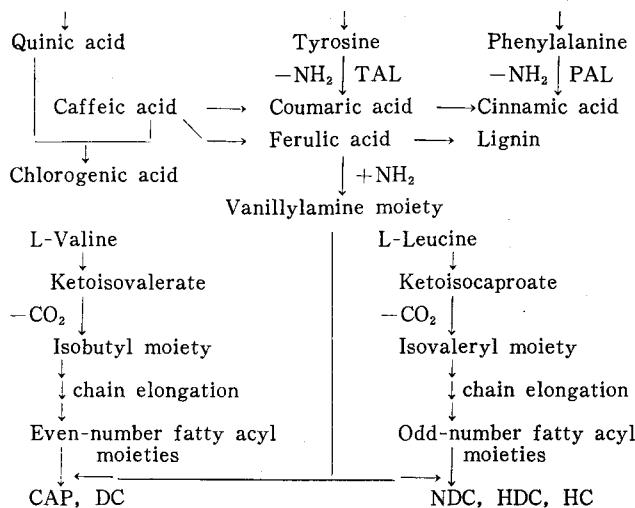


Figure 2. Proposed pathway for the biosynthesis of capsaicin and its analogues.

Table 3. Effects of growth regulators on the formation of phenylpropanoids in *Capsicum annum* L. callus grown in Linsmaier and Skoog basal medium at 28°C ($\mu\text{g}/100\text{g}$ dry weight)

	Growth regulators											
	K			KD			KN			KI		
	5	15	25	5	15	25	5	15	25	5	15	25(day)
Cinnamic acid	205	300	691	210	301	755	202	290	675	202	298	682
Coumaric acid	195	290	672	201	309	721	195	284	632	195	290	661
Caffeic acid	182	280	463	180	312	680	185	202	225	181	275	440
Ferulic acid	152	233	440	161	256	595	145	152	186	151	224	410

K : Kinetin 10^{-6}M

KD : Kinetin $10^{-6}\text{M}+2,4\text{-D}10^{-6}\text{M}$

KN : Kinetin $10^{-6}\text{M}+\text{NAA } 10^{-6}\text{M}$

KI : Kinetin $10^{-6}\text{M}+\text{IAA } 10^{-6}\text{M}$

100g dry wt. 로써 growth regulator 상호간에 큰 차이가 나타나지 않았으며 coumaric acid도 각각 672, 721, 632, 661 $\mu\text{g}/100\text{g}$ drg wt.으로 growth regulator 상호간에 큰 차이가 나타나지 않았다. Caffeic acid와 ferulic acid의 경우 kinetin, 2,4-D, NAA IAA 배지에 생성량 caffeic acid가 463, 680, 225, 440 $\mu\text{g}/100\text{g}$ dry wt.로써 2,4-D 함유 배지에서 가장 생성량이 많았으나, NAA 함유 배지에서는 2,4-D에 비해 약 70% 생성되었다. 이것은 caffeic acid나 ferulic acid의 생성에 미치는 인자가 NAA의 경우 저해작용을

받았거나 혹은 대사경로상에 다른 변화가 나타난 것으로 추정할 수 있었다.

Capsaicin 생성에 관여하는 효소 즉 capsaicin의 대사과정 중 전구체의 하나인 phenylamine을 deamination하여 cinnamic acid을 생성하는 phenylalanine ammonia-lyase activity을 측정된 결과 Figure 3에서와 같은 결과를 얻었다. phenylalanine ammonia-lyase activity가 5일, 15일, 25일에 각각 52, 81, 209 $\text{m}\mu\text{ moles/g}$ of fresh wt.로 15일 이후에 급격한 증가를 나타내었다. Callus培養일수에 따른 capsaicinoids 생성량과 비

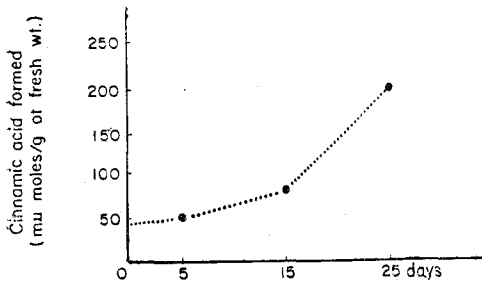


Figure 3. Phenylalanine ammonia-lyase activity of *Capsicum annuum* L. callus cultured in Linsmaier and Skoog basal medium containing kinetin 10^{-6} M and 2,4-D 10^{-6} M.

고추를 배양할 때 25일에 capsaicinoids 생성량이 15일 이후에 급격히 증가하는 현상이 phenylalanine ammonia-lyase 활성의 증가와 일치하는 경향을 나타내었다.

Higuchi와 Shimada¹¹⁾는 竹筍에 관한 실험에서 phenylalanine, tyrosine이 ferulic acid를 거쳐 lignin의 形成에 關여하는 것 같다고 보고하고 있다. 또한 李²⁸⁾는 capsaicin의 vanillylamine부의 生合成과정을 考察하기 위하여 追熟에 따른 phenylalanine 함량과 phenylalanine ammonia-lyase 활성도의 변화를 측정함으로써 capsaicin이 追熟에 따라 서서히 生成되어 최종대사 産物로 축적되는 것으로 추정하였다. 또한 lignin도 追熟에 따라 capsaicin과 같이 점차 증가하였다고 報告하였다.

培養細胞에서 growth regulators가 phenylpropanoid 生成에 미치는 영향은 Liao와 Ibrahim²⁶⁾이 아마의 組織培養에서 培養液中 auxin농도가 높은 경우 cinnamic acid의 산화물질인 P-hydroxy benzoic acid와 vanillic acid의 양이 증가하는 한편 coumaric acid와 ferulic acid의 양은 상당량 감소하였고, 또한 kinetin 농도가 높을 경우에는 coumaric acid와 ferulic acid는 증가하였다고 報告하였다. 또한 cinnamic acid의 전구물질인 phenylalanine의 添加는 cinnamic acid의 양을 증가시켰다. Stickland와 Sunderland²⁷⁾는 *Haplophragma*의 組織培養에서 0.1mg/l의 2,4-D를 添加함으로써 chlorogenic acid를 生成했으며 Gamborg²⁹⁾는 감자의 液體培養에서 C^{14} label된 shikimic acid, quimic acid, coumaric acid, caffeic

acid가 chlorogenic acid의 전구 물질로 작용하였다고 報告하였다.

要 約

고추의 培養細胞에 있어서 고추의 辛味成分인 capsaicinoids 生成에 미치는 growth regulator의 영향을 조사하기 위하여 growth regulator들을 각각 함유한 Linsmaier-Skoog 기본배지에서 培養한 callus의 capsaicinoids를 GLC에 의하여 조사하고 또한 capsaicinoids의 중간대사 산물인 phenylpropanoids와 phenylalanine ammonia-lyase activity를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Growth regulators가 培養細胞의 capsaicinoids 生成에 미치는 영향을 조사한 결과 growth regulators를 달린 배지에서 生成된 capsaicinoids의 含量은 2,4-D 10^{-6} M에서 가장 capsaicinoids의 生成량이 많았으며 IAA 10^{-6} M, NAA 10^{-6} M, kinetin 10^{-6} M의 배지에서는 2,4-D에 비하여 각각 65%, 38%, 68%이었다.

2. Growth regulators를 달린 기본배지에서 生成된 phenylpropanoids는 cinnamic acid, coumaric acid의 生成은 5, 15, 25일에 점진적으로 증가하였으며 NAA 함유 배지에서는 2,4-D에 비해 약 30%, kinetin, IAA 함유배지에서는 약 70% 生成되었다.

3. 2,4-D 10^{-6} M을 함유한 培養細胞에서 phenylalanine ammonia-lyase activity를 측정한 결과 培養後 5, 15, 25日 배양일수에 따라 phenylalanine ammonia-lyase activity는 신선중량 g당 生成된 cinnamate는 각각 52, 81 및 209 μmole로 증가하였다.

參 考 文 獻

1. Nelson, E.K. and L.E. Dawson: The constitution of capsaicin, the pungent principle of *Capsicum*. III. *J. Amer. Chem. Soc.*, **45**, 2179 (1923).
2. Kosuge, S. and M. Furuta: Studies on the pungent principle of *Capsicum*. Part XIV. Chemical constitution of the pungent principle. *Agri. Biol. Chem.*, **34**, 248 (1970).
3. Benett, D.J. and G.W. Kirby: Constitution

- and biosynthesis of capsaicin. *J. Chem. Soc., C*, **442** (1968).
4. Müller-Stock, A., Joshi, R.K. und J. Büchi: Dünnschicht und säulenchromatographische Trennung der Capsaicinoide aus der Droge. *J. Chromatogr.*, **79**, 229 (1973).
 5. Masada, Y., Hashimoto, K., Inoue, T. and M. Suzuki: Analysis of the pungent principles of *Capsicum annuum* by combined gas chromatography-mass spectrometry. *J. Food Sci.*, **36**, 858 (1971).
 6. Leete, E. and M.C.L. Louden: Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 6837 (1969).
 7. 竹内正幸, 石原受也, 右谷力: 培養細胞を代謝研究に使う利點植物組織培養(12-1). 朝倉書店, 東京, 226 (1972).
 8. 李甲郎·崔奉順: 辛味種 고추 果實의 細胞培養 및 辛味成分 生成에 關한 研究. 嶺南大學校 天然物化學研究所 研究報告, 7. 1. 1~6 (1980).
 9. Lee, K.R., Suzuki, T., Kobashi, M., Hasegawa, K. and K. Iwai: Quantitative microanalysis of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin using mass fragmentography. *J. Chromatogr.*, **123**, 119 (1976).
 10. 崔奉順: 植物細胞 培養에 依한 二次代謝產物의 生成에 關한 研究 I. *Capsicum annuum* L. 果實의 callus 形成條件에 關하여. 韓國營養食糧學會誌, **7**(2), 43 (1978).
 11. Higuchi, T. and M. Shimada: Metabolism of phenylalanine and tyrosine during lignification of bamboos. *Phytochem.*, **8**, 1183 (1969).
 12. Carter, C.M., Gheyasuddin, S. and K.F. Mattil: The effect of chlorogenic, quinic, and caffeic acids on the solubility and color of protein isolates, especially from sunflower seed. *Cereal Chem.*, **49**, 508 (1972).
 13. Afzalpurkar, A.B. and G. Lakshminarayana: Changes in chlorogenic, caffeic, and quinic acids contents during sunflower seed. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 203 (1981).
 14. Finkle, B.J. and R.F. Nelson: Enzyme reactions with phenolic compounds a methyltransferase in plants. *Biochim. Biophys. Acta.*, **78**, 749 (1963).
 15. Pickering, J.W., Powell, B.L., Wender S.H. and E.C. Smith: Ferulic acid: A substrate for two isoperoxidases from *Nicotiana Tabacum* tissue cultures. *Phytochem.*, **12**, 2639 (1973).
 16. Koukol, J. and E.E. Conn: The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.*, **236**, 2692 (1961).
 17. Takahashi, M and Y. Yamada: Regulation of nicotine production by auxins in tobacco cultured cell in vitro. *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1755 (1973).
 18. Tabata, M., Yamamoto, H. and N. Hirakawa: Alkaloid production in the tissue cultures of some solanaceous plants. coll. Int. CNRS N°-193 (1971).
 19. Kaul, B., Stohs, S.J. and E.J. Staba: *Dioscorea* tissue cultures. III. Influence of various factors on diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* callus and suspension cultures. *Lloydia.*, **32**, 347 (1969).
 20. Sugano, N., Miya, S. and A. Nishi: Carotenoid synthesis in a suspension culture of carrot cells. *Plant and Cell Physiol.*, **12**, 525 (1971).
 21. Grambow, H.J., Kao, K.N., Miller, R.A. and O.L. Gamborg: Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. *Planta* **103**, 348 (1972).
 22. Obata-Sasamoto, H., Nishi, N. and A. Komamine: Mechanism of suppression of DOPA accumulation in a callus culture of *Stizolobium hassjoo*. *Plant and Cell Physiol.*, **22**(5), 827 (1981).
 23. Tanaka, H., Machida, Y., Tanaka, H.,

- Mukai, N. and M. Misawa: Accumulation of glutamine by suspension cultures of *Symphytum officinals*. *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 987 (1974).
24. Tabata, M., Hiraoka, N., Ikenoue, M., Sano, Y. and M. Konoshima: The production of anthroquinones in callus cultures of *Cassia tora*. *Phytochem.*, **33**, 131(1975)
25. Fujiwake, H., Suzuki, T., Oka, S. and K. Iwai: Enzymatic formation of capsaicinoid from vanillylamine and iso-type fatty acids by cell-free extracts of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. karayatsubusa. *Agric. Biol. Chem.*, **44**(12), 2907 (1980).
26. Liau, S. and R.K. Ibrahim: Biochemical differentiation in flax tissue culture phenolic compounds. *Can. J. Botany.*, **51**, 820 (1973).
27. Stickland, R.G. and N. Sunderland: Photocontrol of growth and of anthocyanin and chlorogenic acid production in cultured callus tissues of *Haplopappus gracilis*. *Ann. Botany.*, **36**, 671 (1962).
28. 李盛雨: 辛味鍾 胡椒의 追熟에 관한 生理化學的 研究. 第2報 辛味成分의 變化. 韓國農化學會誌, **14**(1), 29 (1971).
29. Gamborg, O.L.: Aromatic metabolism in plants. The biosynthesis of chlorogenic acid and lignin in potato cell cultures. *Can. J. Biochem.*, **45**, 1451 (1967).