

Daucus carota 현탁 배양에서 배지 조성 및 세포 응집 크기가 Carotenoid 생합성에 미치는 영향

*윤 정 원 · 김 지 현 · **유 영 제 · ***변 상 요

서울대학교 공과대학 화학공학과

*생물화학공학협동과정

***아주대학교 생물공학과

Effects of Nutrients and Cell Aggregate Size on the Biosynthesis of Carotenoid in *Daucus carota* Suspension Culture

Jeong Won Yun*, Ji Hyeon Kim, Young Je Yoo**, and Sang Yo Byun***

Department of Chemical Engineering*, Biochemical Engineering Program,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea,

***Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon, Korea

ABSTRACT

The effects of nutrients and cell aggregate size on the cell growth of *D. carota* and the biosynthesis of carotenoid were investigated. Highest carotenoid content was obtained with sucrose as a carbon source and the equal ratio of ammonium to nitrate. High phosphate concentration stimulated the carotenoid biosynthesis in *D. carota*. 2,4-D inhibited the cell growth but stimulated the specific carotenoid content at high concentration. By modifying the medium composition based on these findings, three times higher specific carotenoid content and 2.5 times higher total carotenoid content were obtained as compared with the results obtained with basic MS media. Biosynthesis of carotenoid was found to be affected by cell aggregate size: high carotenoid production was obtained from the large aggregated cells resulted from high sucrose concentration.

서 론

식물세포배양은 식물의 totipotency에 기초를 두어 자연의 유용한 산물을 식물 추출에 의하지 않고 직접 세포 배양에 의하여 생성하는 매우 유용한 기술이다. 현재까지 자연계의 250,000-750,000종의 식물중 단지 5-10%만이 screening되어 있으므로 앞으로의 연구 분야

는 매우 광범위하다. 식물 세포 배양에서 얻는 유용한 산물은 주로 의약품, 색소, 향료, 유지 등의 2차대사산물 들이다(1-3). 따라서 이들의 생산 수율은 식물 개체의 특성이나 배양조건등에 의해 크게 좌우되므로 우수한 cell line의 선발과 함께 배지의 최적화, 생물 반응기의 설계 및 반응 공정의 최적화 연구가 필요하다 하겠다. 식물 세포 배양에 사용되는 배지의 조성은 크게

** : to whom correspondence should be made

inorganic macronutrients, inorganic micronutrients, organic nutrients, hormone 등으로 구성된다. Hormone은 주로 auxin과 cytokinin으로 식물의 성장, 분화에 중요한 역할을 하며 그 비에 따라 분화 형태가 다르다. 주로 사용되는 auxin으로는 자연 물질인 3-indoleacetic acid(IAA)와 합성 물질인 1-naphthalenacetic acid(NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)가 있으며 지금까지는 특히 2,4-D에 의한 효과가 많이 관찰되어 왔다. 일반적으로 2,4-D는 세포 분열을 촉진하고 이차대사산물 생성을 억제하는 것으로 알려져 왔으며 *Nicotiana tabacum* 배양에서의 nicotine 생성(4), *Morinda citrifolia* 배양에서의 anthraquinones(5), *Stizobium hassjoo* 배양시 3,4 dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) 생성(6)에서 이를 확인할 수 있었다. 반대로 *Thalictrum minus*에서의 berberine 생산은 2,4-D에 의해 촉진되었다(7).

탄소원으로는 sucrose가 가장 널리 쓰이는데 sucrose 농도는 세포의 성장 뿐 아니라 이차대사산물의 생산에서도 중요하다. *Catharanthus roseus*에서 serpentine, ajmalicine 생산, *Papulus alba*에서의 anthocyanin 생산(8), carrot 현탁 배양에서의 anthocyanin의 함성등은 sucrose 농도가 증가할수록 증가하였다. 반대로 *Nicotiana tabacum*에서의 ubiquinone 함성은 sucrose 농도 증가에 따라 억제되는데(9), 일반적으로는 2-3%의 sucrose가 yield를 높이는 것으로 알려져 있다. 배지내 sucrose의 또다른 역할은 삼투압 효과로 일반적으로 삼투압이 높으면 세포 크기가 감소한다. Drapeau등(10)은 sugar 농도에 의해 fresh cell weight와 dry cell weight비가 변화함을 보여 주었고, *Phytolacca americana* 배양에서 sucrose 농도 증가에 따라 세포수가 증가하고 세포 크기가 감소하는 현상(11)이 관찰되었다.

Nitrate(NO_3^-)와 ammonium(NH_4^+)은 배지내 질소원으로 세포 성장에는 두요소 모두 필요하며(12) 이차대사산물 생성에서는 두 요소의 비율 변화에 따른 효과가 관찰되어 왔다. *Thalictrum minus*에서는 nitrate와 ammonium의 농도비가 5:1 일때 최대 성장을, 그 비가 1:2 일때 berberine의 최대 생산(13)을 보였으며 *Lithospermum erythrorhizon* 배양에서는 nitrate만을 사용하여 skikonin 생산을 촉진하였다(14). Phosphate는 식물의 핵산 대사와 에너지 대사에 필수적인 요소로 많은 경우 식물세포 배양시 성장 제한 요소가 되기도 한다(15). 또한 이차대사산물의 생산에도 영향을 미쳐 *Digitalis purpurea* 배양에서의 digitoxin(16), *Phytoacca americana*에서 betacyanin(15)은 phosphate농도가 증가할수록 생산량이 증가하였다.

현탁 배양에서는 single cell보다 aggregate들이 많이

형성되는데 이것은 분열된 세포가 서로 분리되지 못하여 생성되는 것으로 가장 기초적인 분화 형태로 볼 수 있다(17). 또한 이러한 응집 현상은 세포벽에 세포외 polysaccharide가 coating됨으로써 촉진되기도 한다(18). 식물체의 정상 세포는 원형질 연락사라는 조그만 pore로 서로 연결되어 이를 통해 저분자 화합물이 서로 교환되는 등 cell-to-cell communication을 하며 이는 식물세포 배양시 매우 중요하다. 이러한 aggregate에는 대사 과정에 영향을 미치는 여러 물리, 화학적 인자의 농도 구배가 형성되며 그 크기와 위치에 따라 서로 다른 생화학적, 형태학적 특성을 지니게 되어(17), 이차대사산물 생성에 영향을 미치게 된다. 실제 Kinnersley 등(19)은 carrot현탁 배양시 sieve를 사용, aggregate 크기 별로 선별함으로써 anthocyanin 생산을 증가시켰다.

본 연구에서는 *Daucus carota* 현탁 배양에서 여러 배지 성분들이 세포 성장 및 carotenoid 생합성에 미치는 영향을 고찰하였고 세포 응집 크기와 carotenoid 생합성과의 형태학적인 관계를 연구하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배지 조성

*Daucus carota*를 2,4-D 1 ppm, sucrose 30 g/l를 첨가한 Murashige-Skoog(MS) 배지(20)에서 암조건으로 진탕 배양(150 rpm)하였다. 배양 온도는 27°C로 유지하였다. 세포는 배 7일 간격으로 새로운 배지 150ml를 넣은 500ml Erlenmeyer flask에 이식하여 계대 배양하였다.

현탁 배양

50ml의 액체 배지가 들어있는 250ml Erlenmeyer flask에 1주일된 세포 3.5g(fresh cell weight)를 접종하여 27°C에서 진탕 배양(150rpm) 하였다.

세포 무게 측정

Fresh cell weight는 세포액을 원심 분리(15,000 rpm, 10분)하여 측정하였고 dry cell weight는 원심 분리된 세포를 80°C drying oven에서 24시간 이상 건조시켜 측정하였다.

catotenoid 분석

Carotenoid 분석은 Goodwin등(21)이 제안한 방법을 사용하였다. 먼저 세포를 sonicator (VC 300, Sonics & materials INC, USA)로 분쇄한 후 (pulse 50%, 5분) 시료와 동일 부피의 ethanol을 넣고 60%(w/v) KOH 용액을 전체 부피의 6-10%가 되도록 첨가하였다. 45°C

항온조에서 10-15분간 saponification하여 carotenoid ester를 제거한 후 식힌 시료 용액에 용매로서 petroleum ether를 첨가하여 vortex mixing하여 carotenoid를 추출하였다. 추출된 상등액을 449nm에서 spectrophotometer (KONTRON, UNIKON 930)를 이용하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선으로 정량하였다.

당농도 분석

세포를 원심 분리한 상등액 1ml에 2N HCl 용액 2μl를 넣고 30분간 가열한 후 2N NaOH 용액 20μl를 첨가한 후 DNS법에 의하여 546 nm에서 분석하였다.

결과 및 고찰

식물세포의 성장과 carotenoid 생합성에 미치는 배지 조성의 영향

탄소원이 세포 성장과 carotenoid 생합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 sucrose, glucose, fructose 각 30 g / l를 MS 배지에 첨가 배양하여 결과를 조사 하였다. 결과는 Fig. 1에서와 같이 세포의 성장은 sucrose의 경우에서 제일 우수하였고, glucose, galactose, fructose의 경우에는 세포 성장이 저조하였는데, 특히 fructose의 경우에 세포성장이 심하게 둔화되었다. Carotenoid의 생합성은 sucrose와 glucose를 사용한 경우에는 높았으나, galactose와 fructose의 경우에는 저조하여 탄소원으로는 sucrose가 세포 성장 및 carotenoid의 생합성에 가장 적합하였다. 이것은 Nagarajan(22) 등이 carrot 배양에서 anthocyanin을 생산할 때의 최적 탄소원인 galactose : sucrose의 양이 15 : 5의 경우와는 다른 결과를 보였다. 식물세포에서 물질은 체관부를 통하여 이동되는데 체관내에서 가장 많이 이용되는 물질은 당류로 그 대부

분이 비환원당인 sucrose이다(23). 그러므로 대부분의 식물세포 배양에서는 sucrose를 탄소원으로 사용하며 보통 2-3% 농도 범위에서 수율이 높다고 보고되고 있다.

질소원이 세포 성장과 carotenoid 생합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 NH₄Cl과 KNO₃를 질소원으로 하여 ammonium, nitrate의 비율과 배지내 전체 질소원의 양을 변화시켜 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 먼저

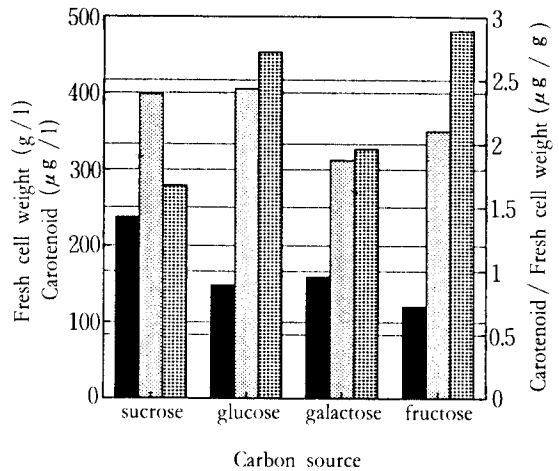


Fig. 1. The effects of various carbon sources on the growth of *D. carota* and the biosynthesis of carotenoid (■: fresh cell wt., ▨: carotenoid, ▩: carotenoid / fresh cell wt.). Sugar concentration was fixed at 30 g / l for each case.

Table 1. The effects of ammonium and nitrate on the growth of *D. carota* and the biosynthesis of carotenoid

Ratio of ammonium to nitrate	Total nitrogen conc. (mM)	Fresh cell wt. (g / l)	Dry cell wt. (g / l)	Carotenoid (μg / l)	Carotenoid / Fresh cell wt. (μg / g)
1:0	60	141.8	7.2	162.3	1.14
0:1	60	80.7	4.0	112.1	1.39
1:2	60	197.7	6.9	224.7	1.14
1:1	30	113.2	6.5	215.3	1.90
1:1	60	143.9	7.4	281.6	1.95
1:1	90	121.2	7.4	230.5	1.90

Samples were taken at the 11th day of cultivation.

ammonium과 nitrate를 각각 첨가하여 배양한 경우에는 ammonium과 nitrate가 동시에 존재하는 기본 MS 배지에서 보다 세포 성장과 carotenoid 생합성 양이 낮았다. 그러나 ammonium 만을 질소원으로 한 경우는 nitrate를 질소원으로 한 경우 보다 1.8배 가량 세포 양이 많아 세포 성장에는 ammonium 형태가 nitrate보다 중요하였다. 식물에 의해 흡수된 nitrate는 식물체 내에서 두 효소 촉매 반응을 거쳐 ammonium으로 환원되어 아미노산이나 다른 질소 화합물로 전환된다(23). 이때 nitrate reductase 효소는 nitrate에 의해 유도되며 이 조절 현상은 배지 내 ammonium 농도에 의해 억제된다. 그러므로 세포 성장에는 세포가 먼저 이용할 수 있는 ammonium이 필요하다. 이것은 nitrate보다 ammonium이 세포내로 먼저 흡수되었다는 Wilson등(24)의 보고에서도 확인되었다. 그러나 ammonium은 강한 독성물질로 세포내에 축적되지 않으며 뿌리 배양에 많이 이용되는 White 배지(20)에는 ammonium이 존재하지 않는다. 또한 Takayama 등(12)은 두 질소원 첨가시 세포 성장이 촉진됨을 보고하였고 *D. carota* 배양시 기본 MS 배지에서 세포 성장 및 carotenoid 생합성 양이 높으므로 ammonium과 nitrate 두 형태 모두가 중요하다.

MS기본 배지의 질소원 양은 60mM로 ammonium : nitrate 비율은 mole 농도비로 1 : 2이다. 실험에서 ammonium 이 nitrate보다 세포 성장에 중요하였으므로 두 질소원의 농도비를 1 : 1로 하여 전체 질소원의 양을 30mM, 60mM, 90mM로 변화시켜 세포를 배양하였다. Rosmarinic acid는 질소원의 농도가 낮아졌을 때 생산이 증가되었으나(25), *D. carota*는 배지내 질소원의 농도가 60mM일때 Table 1에서와 같이 세포 성장과 전체 carotenoid 생산량은 최적의 결과를 나타내었다. 그러나 60mM 동일 농도에서 ammonium : nitrate가 1 : 2인 경우에 비해 세포 성장은 감소하였으나 전체 carotenoid 생산량과 비 carotenoid 함량은 증가하였다. 이것은 ammonium이 세포 성장에 중요하지만 그 toxicity로 인하여 최적 농도가 존재함을 의미하며 *Thalictrum minus*(13)에서도 이를 확인할 수 있었다. 특히 전체 질소원 양의 변화에 관계없이 세 경우 모두 비 carotenoid 함량이 1.9-1.95로 ammonium과 nitrate 비가 1 : 2인 경우에 비하여 1.7배 가량 증가하였으므로 carotenoid 생합성은 배지내 ammonium : nitrate가 1 : 1일 때 최적이었다.

인산염이 세포성장 및 carotenoid 생합성에 미치는 영향을 조사하기 위해 인은 주로 1가 인산 이온 ($H_2PO_4^-$)의 형태로 흡수되므로 인산염인 KH_2PO_4 농도를 10, 150, 200, 250 mg/l로 하여 10일간 배양하였다. Fig.2

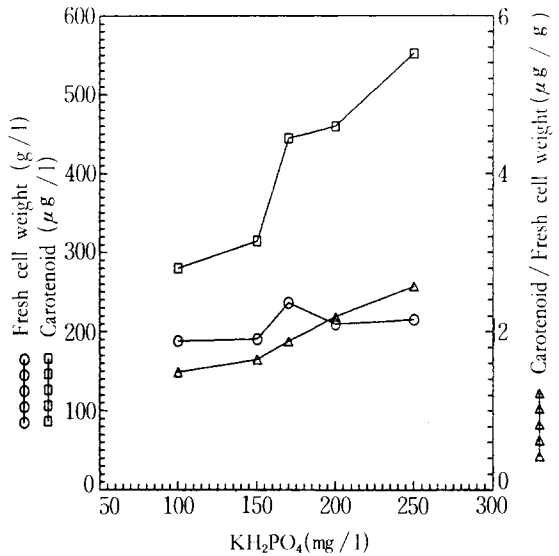


Fig. 2. The effects of initial phosphate concentration on the growth of *D. carota* and the biosynthesis of carotenoid.

에서 보는 바와 같이 세포 성장은 초기 인산염의 증가에 따라 증가하였는데 이것은 Dougall등(26)의 보고와 일치하였다. 인산염의 농도가 증가할 수록 carotenoid 생합성도 증가하여 특히 비 carotenoid 함량은: KH_2PO_4 250mg/l에서 2.6μ g/g fresh cell weight로 최대로 되었다. 인은 광합성, 호흡, 및 막 성분인 인지질의 구성요소로 세포구조 및 대사에 관여하므로 인산염이 세포 성장과 carotenoid 생합성에 중요한 제한 요소가 됨을 시사하고 있고, Dougall 등(27)은 과량의 인을 함유한 배지에서 반연속적 배양을 하여 세포 성장속도 및 anthocyanin 합성을 증대시켜 이를 확인하였다.

호르몬의 영향에서 auxin으로 2,4-D의 영향을 조사해 본 결과 Fig. 3에서와 같이 세포의 성장에는 1mg/l의 농도가 가장 좋았으나 carotenoid 생합성은 2,4-D의 농도가 10mg/l인 경우가 1mg/l인 경우에 비하여 2배 가량 높았다. 이는 2,4-D가 carotenoid의 생합성을 촉진한다는 Mok 등(28)의 보고와 일치하며 *Thalictrum minus*에서의 berberine 생산도 2,4-D에 의해 촉진되는 것으로 보고되었다(7). 그러나 2,4-D는 이차대사산물의 생합성을 억제한다는 보고가 많은데(4,5,6,29) 이는 세포주와 생산되는 이차대사산물마다의 독특한 성질로서 본 연구 결과에서는 2,4-D를 전혀 넣지 않은 경우에는 세포 성장과 carotenoid 양이 모두 감소하였고 2,4-D농도가 10mg/l에서

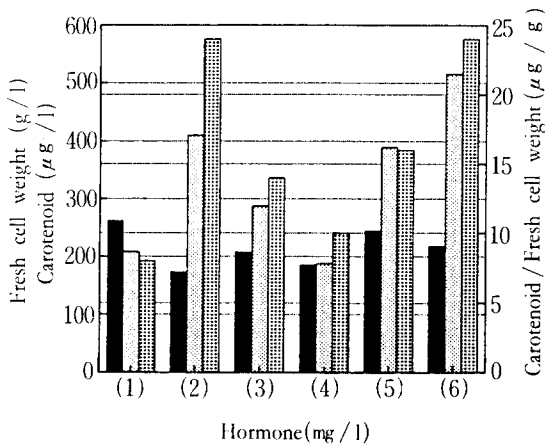


Fig. 3. The effects of hormones and phosphate on the growth of *D. carota* and the biosynthesis of carotenoid (■: fresh cell wt., ▨: carotenoid, ▩: carotenoid/fresh cell wt.) (1) 2,4-D: 1 mg/l (2) 2,4-D: 10mg/l (3) kinetin: 1mg/l (4) hormone-free (5) hormone-free + KH₂PO₄: 300mg/l (6) 2,4-D: 1mg/l + KH₂PO₄: 300mg/l

의 세포성장이 2,4-D가 없는 경우에서 보다는 낮은 것으로 나타나고 농도의 2,4-D는 세포성장을 저해하는 것으로 판단되었다.

Cytokinin으로 kinetin만을 첨가한 경우는 세포성장이 낮아 세포 농도가 2,4-D 1mg/l인 경우의 80% 정도에 머물렀는데 비 carotenoid 함량은 오히려 1.7배 정도로 높아져 전체 부피당 carotenoid 생산량이 증가되었다. Ozeki 등(30)은 carrot 세포배양에서 kinetin을 사용하여 anthocyanin 합성을 촉진시켰는데 이는 kinetin이 carrot 배양시 이차대사산물 생합성에 관여하고 있음을 시사하고 있다.

Hormone과 함께 KH₂PO₄를 300mg/l로 충분히 넣어준 결과를 (control에서의 KH₂PO₄ 농도=170 mg/l) 살펴 보았다. Fig. 3에서와 같이 먼저 hormone이 전혀없이 인산염 만 300mg/l로 증가시킨 결과 세포 성장은 control의 93%에 달하여 비교적 양호하였고 비 carotenoid 함량은 control의 2배로 전체 부피당 carotenoid 함량도 2배 가량 증가하였다. 인산염 300mg/l와 2,4-D 1mg/l를 동시에 첨가하여 배양한 결과 세포 성장은 control의 83%로 약간 낮았으나 비 carotenoid 함량이

3배가 되어 전체 부피당 carotenoid 생성량은 516mg/l (control에서의 carotenoid 생산량 = 208 mg/l)로 증가되었다. 이상의 결과로부터 2,4-D와 인은 carotenoid 생합성을 촉진하는 것을 알 수 있었다.

세포 응집 크기에 따른 carotenoid 생합성 효과

초기 sucrose 농도를 10 g/l와 80 g/l로 달린 배지에서 세포를 배양하여 세포 응집 크기가 carotenoid 생합성에 미치는 영향을 고찰하였다. 액체 현탁 배양시 배양액내에 세포 응집체들이 존재하는데 세포 응집 크기와 carotenoid 생성간의 관계를 stainless steel mesh를 이용하여 세포 응집 크기별로 세포를 선별하여 고찰하였다. 세포를 응집 크기에 따라 45-90 µm, 90-200 µm, 200 µm 이상으로 분류하여 각각의 carotenoid 생성량을 비교하였다. Fig. 4에서와 같이 비 carotenoid 함량은 sucrose 농도가 10 g/l인 경우에는 세포 응집 크기에 따라 차이가 없었으나, sucrose 농도가 80 g/l인 경우 비 carotenoid 함량은 세포 응집 크기가 증가함에 따라 증가하여 sucrose 농도가 10 g/l인 경우보다 높은 값을 나타내었다. 보통 식물세포는 성장이 둔화되면서 응집체를 형성하고, 조직화 되면서 이차대사가 진행되는 것으로 알려져 있다. *D. carota* 배양에서는 sucrose에 의한 저해 현상이 관측되므로 sucrose 농도가 80 g/l인 경우에는 기질저해 현상으로 인한 세포 성장의 둔화로 이차대사가 turn-on 되어 비 carotenoid 함량이 증가하는 것으로 판단되었다. 식물세포 배양으로 생산하는 이차대사산물은 그 양이 모식물체에 비하여 낮은 경우가 많은데 자연계의 식물체는 고도로 분화된 조직적이고 미분화 상태의 세포를 기관으로 재분화하였을 때 생산되거나 생산량이 증가하는 경우가 관찰되므로(31) 이차대사산물 생성은 분화된 조직과 관련되어 있는 경우가 많다. 응집체도 분화의 가장 기초적인 단계로 세포 상호간의 원형질 연락사를 통한 물질전달이 가능하고 환경에 따른 세포의 생리학적 변화가 초래되어, 응집 크기에 따라 생산량이 다를 수 있다. 또한 응집 크기가 증가할수록 분화에 가까운 것으로 판단되어 생산 함량이 높은 것으로 해석되었다.

Hormone 효과에 따른 세포배양시 mesh를 사용하여 분석한 경우도 Table 2에서와 같이 세포 응집 크기에 따라 비 carotenoid 함량이 증가하는 동일한 결과를 나타내었다. 그러나 세포 응집 크기가 증가하면 비생산성은 증가하나 반응액의 비균질성이 초래되고 세포 응집 내부로의 물질전달 문제가 발생하게 되므로 반응시 최적의 응집 크기가 존재할 것이며 이를 제어하는 연구가 필요하다고 하겠다.

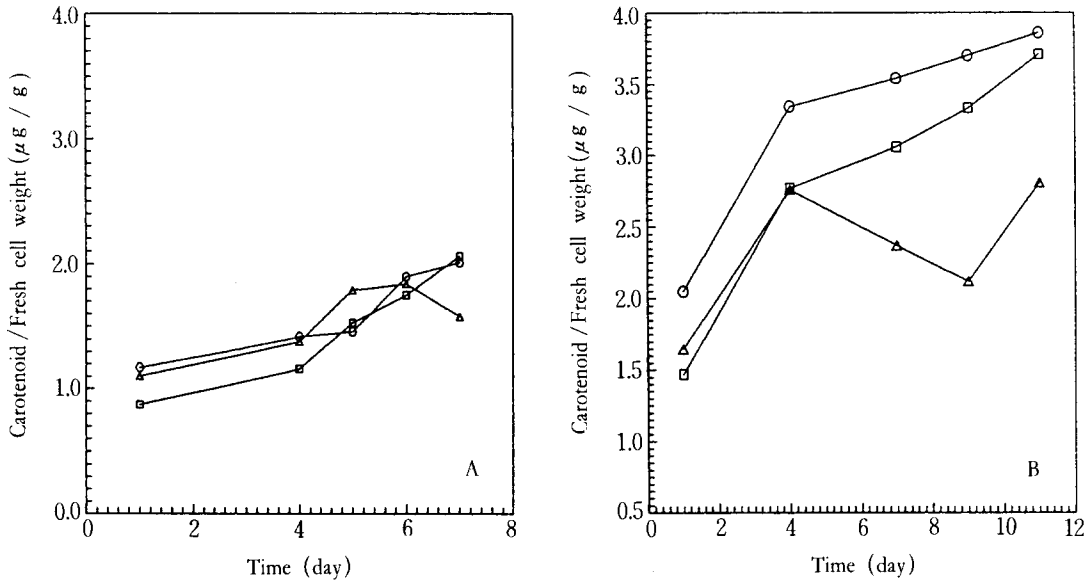


Fig. 4. Aggregate sizes and specific carotenoid contents at different initial sucrose concentrations during the cultivation of *D. carota*. (a) sucrose: 10 g/l, (b) sucrose: 80 g/l, (○: larger than 200 μm, □: 90-200 μm, △: 45-90 μm)

Table 2. The effects of cell aggregate size and initial nutrient concentration (hormone, phosphate) on specific carotenoid content

Cell aggregate size (μm)	Specific carotenoid content (μg/g fresh cell)					
	2,4-D (1mg/l)	2,4-D (10mg/l)	kinetin (1mg/l)	no hor.	no hor. with phos. (300mg/l)	2,4-D (1mg/l) with phos. (300mg/l)
>200	0.98	2.65	1.93	1.39	3.59	3.11
90-200	0.86	2.58	1.33	1.23	1.56	2.72
45-90	0.72	2.21	1.24	0.82	1.52	1.93

Samples were taken at the 10th day of cultivation.

요 약

Daucus carota 세포 배양과 carotenoid 생합성에 영향을 미치는 여러 배지 성분을 조사하였고 세포 응집 크기와 carotenoid 생합성과의 관계를 고찰하였다. 탄소원으로는 sucrose가 적합하였고 전체 질소원의 농도가 60mM일때 세포 성장과 carotenoid 생합성이 우수하였으며 세포

성장은 ammonium과 nitrate의 농도비가 1 : 2일때, carotenoid 생산은 1 : 1일때 최적이었다. 인산염은 그 농도가 증가할 수록 carotenoid 생합성이 증가하였고, 고농도 2,4-D에서 세포 성장은 저해되나 비 carotenoid 함량은 증가하였다. 이를 기초로 2,4-D 1mg/l, 인산염 300mg/l를 함유한 MS배지에서 세포를 배양한 결과 표준 MS 배지를 사용한 결과보다 비 carotenoid 함량은

3배, 전체 부피당 carotenoid 생산을 2.5배 증가시켰다. 또한 sucrose 농도가 높은 경우 세포 응집 크기가 큰 것으로 나타났으며 세포 응집 크기가 환수복 carotenoid 생합성이 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 교육부 유전공학분야 학술연구조성비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. M. F. Balandrin, J. A. Klocke, E. S. Wurtele, and W. Bollinger (1984), *Science*, **228**, 1154.
2. Y. Yamada and F. Sato (1981), *Phytochemistry*, **20**, 545.
3. S. S. Radwan and C. K. Kokate (1980), *Planta*, **147**, 340.
4. T. Furuya, H. Kojima, and K. syono (1971), *Phytochemistry*, **10**, 1529.
5. M. H. Zenk, H. El-Shagi, H. Arens, J. Stockigt, E. W. Weiler and B. Deus (1977), *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*(W. Barz, E. Reinhard, and M. H. Zenk eds.) p. 27, Springer-Verlag, Berlin and New York.
6. H. Obata-Sasamoto and A. Komamine (1983), *Planta Med.*, **49**, 120.
7. K. Nakagawa, H. Fukui, and M. Tabata (1986), *Plant Cell Rep.*, **5**, 69.
8. T. Matsumoto, K. Nishida, M. Noguchi, and E. Tamaki (1973), *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 561.
9. T. Ikeda, T. Matsumoto, and M. Noguchi (1976), *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1765.
10. D. Drapeau, H. W. Blanch, and C. R. Wilke (1986), *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1555.
11. J. M. Merillion, M. Rideau, and J. C. Chenieux (1984), *Planta Med.*, **48**, 497.
12. S. Takayama, M. Misawa, K. Ko, and T. Misato (1977), *Physiol. Plant*, **41**, 313.
13. K. Nakagawa, A. Konagai, H. Fukui, and M. Tabata (1984), *Plant Cell Rep.*, **3**, 254.
14. Y. Fujita, Y. Hara, C. Suga, and T. Morimoto (1981), *Plant Cell Rep.*, **1**, 61.
15. M. Sakuta and A. Kommamine (1985), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (F. Constabel, and I. K. Vasil eds.) vol. **4**, 97, Academic Press.
16. M. Hagimori, T. Matsumoto, and Y. Obi (1982), *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1205.
17. M. L. Shuler (1990), *Proceedings of APBioChEC'90*, p. 24.
18. A. H. Scragg and M. W. Fowler (1985), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (I. K. Vasil ed.) vol. **2**, 103, Academic Press.
19. A. M. Kinnersley and D. K. Dougall (1980), *Planta*, **149**, 200.
20. S. H. Mantell, J. A. Matthews, and R. A. McKee (1985), *Principles of Plant Biotechnology*, 227, Blackwell Scientific Publications.
21. B. H. Davies (1976), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (T. W. Goodwin ed.) vol. **2**, 38, Academic Press.
22. R. P. Nagarajin, E. Keshaverz, and D. F. Gerson (1989), *J. Ferm. Bioeng.*, **68**, 102.
23. F. B. Salisbury and C. W. Ross (1987), *Plant Physiology*, 3rd eds., p. 96, Wadsworth Pub., Belmont.
24. G. Wilson and P. Marron (1978), *J. Exp. Bot.*, **29**, 837.
25. W. De-Eknamkul and B. Ellis (1988), *Plant Cell Rep.*, **4**, 46.
26. D. K. Dougall and K. W. Weyrauch (1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 337.
27. D. K. Dougall, S. Labrake, and G. H. Whitten (1983), *Biotech. Bioeng.*, **25**, 581.
28. M. C. Mok, W. H. Gabelman, and F. Skoog (1976), *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **101**, 442.
29. M. Tabata, H. Mizukami, N. Hiraoka, and M. Konoshima (1974), *Phytochemistry*, **13**, 927.
30. Y. Ozeki and A. Komamine (1981), *Physiol. Plant*, **53**, 570.
31. S. B. R. Bhandary, H. A. Collin, E. Thomas, and H. E. Street (1969), *Ann. Bot.*, **33**, 647.

(Received; October 23, 1990, Accepted; December 31, 1990)