

캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia californica*) 현탁세포배양에서 전구체가 알칼로이드 생성에 미치는 영향

주영운·김철*·변상요
아주대학교 공과대학 생물공학과
*아주대학교 공과대학 화학공학과

Precursor Feeding Effects of Alkaloid Production in Suspension Cultures of *Eschscholtzia californica*

Young Woon Ju, Chul Kim* and Sang Yo Byun

Department of Biotechnology and *Department of Chemical Engineering,
College of Engineering, Ajou University, Suwon 441-749, Korea

ABSTRACT

The accumulation of benzophenanthridine alkaloids, sanguinarine, chelerythrine, chelirubine and macarpine occurred in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. To increase alkaloid production, feeding experiments with the biosynthetic precursors, tyrosine, tyramine, L-dopa, dopamine with and without elicitation were studied. In feeding experiments with various precursors, the total alkaloid production was slightly increased. The precursor feeding with elicitation, however, increased total alkaloid production several time.

서 론

캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia californica*) 현탁배양세포는 sanguinarine, chelirubine, chelerythrine과 macarpine 등과 같은 benzophenanthridine alkaloid를 축적하는 것으로 보고되고 있다(1). 또한 elicitation시 benzophenanthridine alkaloid들의 생성변화와 그에 관련된 효소의 활성화에 대해서도 보고되고 있다(2). Benzophenanthridine alkaloid는 치과의료용으로 최근에 관심을 모으고 있다(3, 4). 몇몇 보고에 의하면 식물세포 배양시 생합성 전구체 투입에 의해 이차대사산물의 생성이 증가했다고 보고(5-7)된 반면 몇몇 다른 보고에서는 부작용 내지 영향이 없는 것으로 보고되고 있다(8, 9). 이것으로 보아 아직 전구체 투입에는 일반 법칙

이 없는 것으로 보이며 각각의 물질을 각각의 식물 배양체에 투입해 봄으로써 테스트해야 한다는 것도 알 수 있다.

현재 tyrosine에서 sanguinarine까지의 benzophenanthridine alkaloids 생합경로(Fig. 1)에 17개의 효소가 관여한다는 것까지 밝혀져 있는데(10-12), 본 연구에서는 이 생합성 경로의 전구체를 캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia californica*) 현탁배양세포에 투입할 때 이차대사산물의 생성과 세포량 변화에 미치는 영향에 관해 연구하였다. 그리고 일반적으로 elicitor 처리에 의해 이차대사 활성화와 관계된 유전자의 전사와 해독을 유도하여 biotransformation을 증가시킬 수 있다는 보고(3, 13)에 따라 전구체와 yeast elicitor를 동시에 투입할 때 이차대사산물의 생성과 세포량 변화에 관해 전구체 단독 투입시와

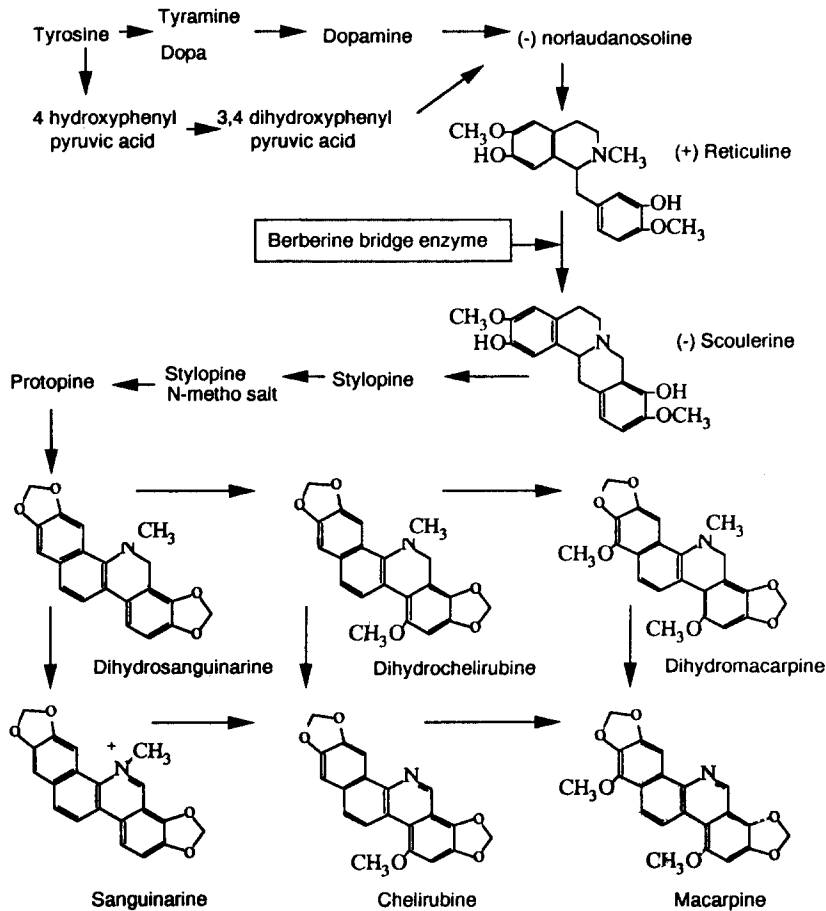


Fig. 1. The biosynthetic pathway of benzophenanthridine alkaloids.

비교 연구하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 배지

본 연구에서는 1984년 캐나다에서 개발된 캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia californica*) 세포주를 이용하였다. 이 세포주(cell line)는 Dr. Peter Brodelius(ETH, Zurich, Switzerland)로부터 기증 받았다. 이들은 5μM, 2,4-D와 0.5μM kinetin 그리고 탄소원으로 20g/l의 Sucrose가 첨가된 B₅ 기본배지(14)에 유지 배양중이다. 배지의 pH는 1N KOH를 사용하여 5.8로 조정하였다. 현탁배양을 유지하기 위해, 200ml 배지가 든 500ml 삼각플라스크에 7일간격으로 세포와 배지의 비율을 1:3 정도로 하여 계

대배양하였다. 회분배양 실험을 위해 40ml의 배지가 든 100ml 삼각플라스크를 180rpm으로 진탕배양하였다. 배양실의 온도는 26℃로 유지하였고 하루에 18시간씩 형광등 빛을 조사하였다. 이때의 조도는 +4μEi/m²s이었다.

시약

Standard용 sanguinarine과 전구체 투여용 L-tyrosine, L-dopa, dopamine·HCl, tyramine 그리고 HPLC 분석용 ion-pairing agent인 TBA는 Sigma사(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. HPLC 분석용 용매인 acetonitrile, methanol, 그리고 물 등은 Fisher사(Rochester, NY)에서 구입하였다. Yeast elicitor는 Hahn 등(15)의 알코올 침전법에 의해 yeast extract(Difco사, Detroit, MI, U.S.A.)에서

분리하여 이용하였고 그것의 농도는 Orcinol-sulfuric acid법(16)에 의해 측정하였다. 기타 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

알칼로이드 표준물질 분리

Macarpine은 시중 구입이 어려워 배양세포로부터 직접 추출 분리하였다. 현탁배양 중인 캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia californica*)를 여과하여 fresh cell 약 500g(dry cell 20g)을 취하여 1.5ℓ methanol에 현탁한 후 상온에서 밤새 섞어준다. 이것을 여과하여 여과된 세포를 다시 1ℓ methanol로 세척하여 약 2.5ℓ의 메탄올 추출물을 얻는다. 이것을 감압 증류한 후 20ml의 초산과 물(50:50, v/v)용액에 현탁시키고 다시 여과한다. 이 여과된 용액에서 petroleum ether 200ml를 이용하여 유색물질을 추출하여 제거하고, 나머지 수용액층을 취하여 암모니아수로 15% 알칼리용액으로 만든다. 이 알칼리 용액을 400ml의 chloroform으로 추출한 후 감압증류하여 유기용매를 날려버린다. 이렇게 하여 얻은 캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia californica*)의 알칼로이드 추출물을 10ml의 methanol에 녹인 후 이중 1ml를 C-18 sorbents(Sigma Co., 60Å 40-63μm)가 충전되어 있는 분리용 column(10×170mm)에 loading하였다. 이동상은 acetonitrile과 물을 35:65로 섞어 흘려주었다. Macarpine peak는 mass spectrometer를 이용하여 동정하였다.

삼각플라스크에서의 회분배양 실험방법

삼각플라스크에서의 회분배양 실험을 위해, 보통 4~5일 된 exponential growth phase 말기의 현탁배양 세포를 이용하였다. 접종 세포간의 이질성을 피하기 위하여 500ml 삼각플라스크에서 배양하던 세포를 미리 멸균해 두었던 큰 삼각플라스크에 모아 고르게 섞어준 다음, 그 세포는 Buchner 깔때기(Whatman No. 1)를 통해 약한 진공하에서 여과하고 신선한 배지로 닦아준 다음 다시 여과한다. 여과된 fresh cell을 40ml 배지가 든 100ml 삼각플라스크에 3.5g씩 접종한다. 모든 실험은 정확을 기하기 위해 하나의 데이터에 2개씩 샘플하였다. 그렇게 취한 샘플은 세포와 배지를 각각 모아 세포의 성장과 세포내·외 산물의 양 측정 그리고 당분석에 이용하였다.

세포량 측정

배양된 세포를 약한 진공으로 여과(Whatman

No. 1)하고, 그 세포를 증류수로 세척 후 더 이상의 물이 떨어지지 않을 때까지 다시 여과한다. 세척된 세포를 미리 무게를 측정한 알루미늄 용기를 이용해 가능한 빨리 저울로 무게를 측정하여 Fresh Cell Weight(FCW)를 결정한 후, 60°C 오븐에서 항량에 도달할 때까지 건조시킨 후 Dry Cell Weight(DCW)를 결정한다.

알칼로이드 분석

세포와 배지를 여과(Whatman No. 1)하여 각각을 모아 세포내·외 알칼로이드 분석에 이용한다. 세포내 알칼로이드의 농도는 fresh cell 1g을 취하여 HPLC용 메탄올 10ml에 넣고 상온에서 15분 sonication하여 추출한다. 그리고 모든 추출물을 주입전 0.45μm membrane filter로 여과 후 20μl를 주입한다. 알칼로이드의 HPLC 분석 조건은 변등(17)의 조건 중 몇 가지를 변형하여 이용하였다. HPLC는 UV/Vis detector(Waters, 484)와 prefilter가 달려 있는 C-18 reverse phase column(μbondapak C-18 125Å 10μm 3.9×300mm)으로 이루어져 있다. 이동상은 상온에서 acetonitrile과 물을 35:65로 유지하여 1.3ml/min로 흘려 주었다. 이때 물에는 1mm TBA와 pH를 2로 조정하기 위하여 인산을 넣어 주었다. 알칼로이드는 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 위의 환경에서 선형 표준곡선은 sanguinarine의 경우 100mg/ℓ, macarpine의 경우 80mg/ℓ 까지 얻을 수 있었다. 그러나 같은 조건임에도 불구하고 메탄올과 물에 녹아 있는 알칼로이드들은 다른 peak 모양과 retention time 그리고 적분면적을 나타내었다. 그러므로 세포내·외의 알칼로이드 분석을 위해서는 메탄올과 물에 각각 standard를 녹여 구분하여 사용하였다.

결과 및 고찰

Dopamine의 효과

Exponential phase 말기의 현탁세포에 다른 양의 dopamine을 주입한 후 33시간 후에 샘플하였다. Fig. 2는 dopamine 투여농도가 알칼로이드 생성, 세포성장 그리고 pH에 미치는 영향을 나타내었다. 그 결과 FCW는 dopamine 투여농도 증가에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 알칼로이드 생성은 0.05mg dopamine/g FCW에서 약간 증가했을 뿐 오히려 역작용하는 것으로 나타났다. 특히 dopamine 투여에 의해 현탁세포의 갈변이 아주 심해지는 것을 관찰할

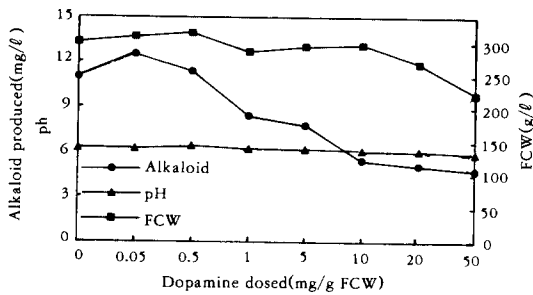


Fig. 2. Dopamine feeding effects pH, on cell growth and alkaloid production in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*.

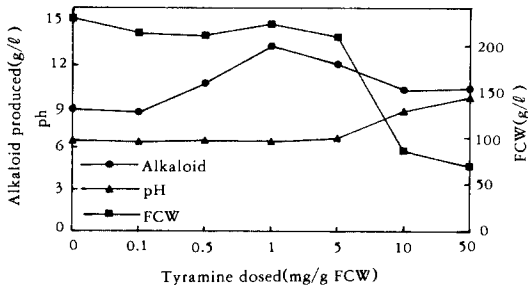


Fig. 3. Tyramine feeding effects on pH, cell growth and alkaloid production in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*.

수 있었다. pH의 변화는 거의 없었으나, 과량의 dopamine 투여에 의해 pH가 낮아졌는데, FCW의 감소와 상당한 관계가 있는 것으로 생각된다.

Tyramine의 효과

Exponential phase 말기의 현탁세포에 다른 양의 tyramine을 주입한 후 33시간 후에 샘플하였다. Fig. 3는 tyramine 투여농도가 알칼로이드 생성, 세포성장 그리고 pH에 미치는 영향을 나타내었다. 그 결과 tyramine 투여에 의해 FCW는 5mg tyramine/g FCW까지는 거의 영향이 없는 것 같았으나 그 후 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 알칼로이드 생성은 전반적으로 증가하였는데 특히 1mg tyramine/g FCW 부근에서 최대 알칼로이드 생성이 나타났다. 그리고 1mg tyramine/g FCW까지는 pH 변화가 거의 없었으나, 5mg tyramine/g FCW 이상의 전구체를 과량으로 투여했을 때 상당한 pH 증가와 함께 급격히 FCW가 감소하였다. 현재까지의 연

구결과에 의하면 식물세포는 pH 조절 능력이 있다고 보고(18)되고 있기는 하나, 과량의 tyramine 투여의 경우 세포가 파괴됨으로써 FCW 감소 및 pH가 증가된 것이라 생각된다.

Dopa의 효과

Exponential phase 말기의 캘리포니아 양귀비 현탁세포에 다른 양의 dopa를 주입한 후 36시간 후에 샘플하였다. Fig. 4는 L-dopa 투여 농도가 pH, 세포 성장과 알칼로이드 생성에 미치는 영향을 나타내었다. 그 결과 dopa 투여에 의해 FCW와 pH는 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 알칼로이드 생성은 L-dopa 농도의 증가에 따라 증가하였는데 특히 10mg dopa/g FCW 부근에서 최대 알칼로이드 생성이 나타났다. Tyramine이나 dopamine과 마찬가지로 dopa의 농도가 증가할수록 배지의 갈변이 심하였다.

Tyrosine의 효과

Tyrosine은 1963년 Leete에 의해 benzophenanthridine 골격의 전구체로 보고된(10) 이후 이를 이용한 protoberberine 계열의 알칼로이드 대사경로 연구에 많이 이용되고 있다. Exponential phase 말기의 캘리포니아 양귀비 현탁세포에 다른 양의 tyrosine을 주입한 후 36시간 후에 샘플하였다. Fig. 5는 tyrosine 투여농도가 세포 성장과 알칼로이드 생성에 미치는 영향을 나타내었다. 그 결과 tyrosine 투여에 의해 FCW는 거의 영향이 없는 것으로 나타났다. 알칼로이드 생성은 tyrosine 투여 농도의 증가에 의해 증가하였는데, 생성 증가는 특히 5mg tyramine/g FCW 부근에서 최대 알칼로이드 생성이 나타났다. Tyrosine 투여시 캘리포니아 양귀비 현탁세

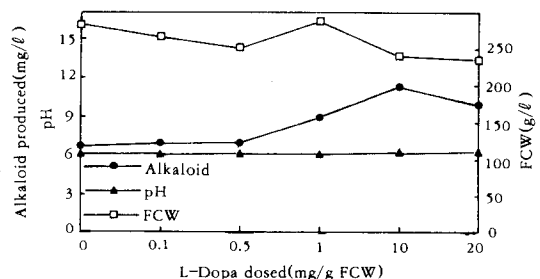


Fig. 4. L-Dopa feeding effects on pH, cell growth and alkaloid production in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*.

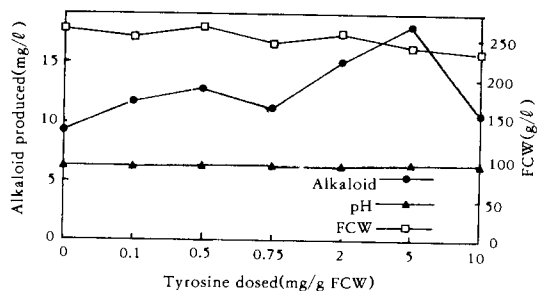


Fig. 5. Tyrosine feeding effects on pH, cell growth and alkaloid production in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*.

또는 다른 전구체 투여시와는 달리 세포의 갈변이 나타나지 않았다.

Brodelius 등(19)은 캘리포니아 양귀비의 현탁배양세포에 효모 추출물 elicitor를 처리하면 L-tyrosine decarboxylase(TDC) 활성이 유도된다는 것을 보고하였다. 그리고 그는 *T. rugosum*의 현탁배양세포에 효모 추출물 elicitor와 고농도(1mm) tyrosine을 처리하였을 때 TDC 활성과 그에 따른 berberine 합성에 대해서도 연구하였는데, 효모 추출물 elicitor 0.4mg/g FCW 처리 20시간 후 TDC가 최대로 유도되며, 변이 캘리포니아 양귀비에서 보고한 바와 마찬가지로 exponential phase 말기 또는 stationary phase 초기에 elicitor를 처리하는 것이 이차대사활성을 유도하는 데 좋다는 것이 보고되었다(20). 여러 biotic elicitor를 캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia californica*) 현탁배양세포에 사용한 결과 benzophenanthridine 알칼로이드 생성에 양성적인 결과를 얻었고 그 중 특히 효모추출물 elicitor가 효과가 가장 좋은 것으로 보고되었다(16). Elicitor 처리에 의해 이차대사활성과 관계된 유전자의 전사와 해독을 유도함으로써 전구체 투여시 이차대사산물의 증가 가능성을 biotransformation의 촉진이란 측면에서 실험한 결과는 다음과 같았다.

Dopamine 투여시 elicitor의 영향

Elicitor를 넣지 않고 현탁세포에 dopamine을 투여하는 것을 알칼로이드 생성에 효과가 거의 없었다. Exponential phase 말기의 현탁세포에 효모 추출물 elicitor 80 μ g/g FCW와 다른 양의 dopamine을 투여한 후 33시간 후에 샘플하였다. Fig. 6는 elicitor를 투여하였을 때 dopamine 투여농도가 세

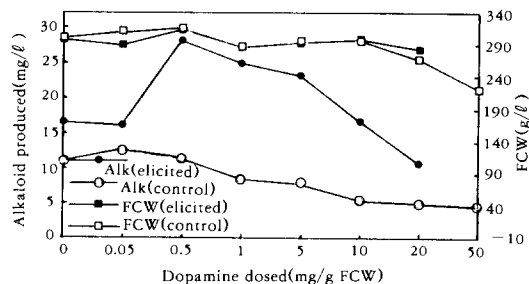


Fig. 6. Effects of dopamine feeding with elicitation on cell growth and alkaloid production in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*.

포성장과 알칼로이드 생성량에 미치는 영향을 나타내었다. 그 결과 dopamine 단독 투여시와는 다른 양상을 보였다. Elicitor를 함께 투여하였을 때 dopamine 투여에 의해 FCW는 50mg tyramine/g FCW 외에는 거의 영향을 받지 않았고, 알칼로이드 생성에 있어서도 elicitation 없었을 때보다도 훨씬 증가 하였다. 그리고 알칼로이드의 분포에 있어서도 elicitor를 투여하지 않았을 때와는 달리 elicitor를 투여에 의해 extracellular 알칼로이드의 비율이 감소하는 것으로 나타났다.

Tyramine 투여시 elicitor의 영향

Exponential phase 말기의 현탁세포에 효모 추출물 elicitor 80 μ g/g FCW와 다른 양의 tyramine 투여한 후 33시간 후에 샘플하였다. Fig. 7은 elicitor를 투여하였을 때 tyramine 투여농도가 세포성장 및 알칼로이드 생성량에 미치는 영향을 나타내었다. 그

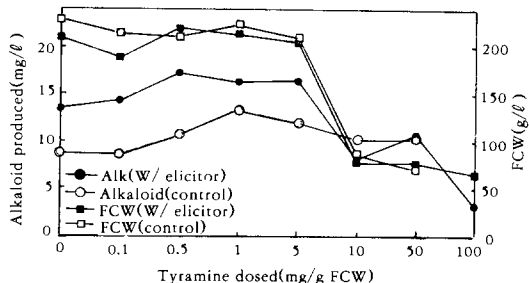


Fig. 7. Effect of tyramine feeding with elicitation on cell growth and alkaloid production in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*.

결과 elicitor를 함께 투여하였을 때 tyramine 투여에 의해 FCW는 고농도에서 상당히 감소하였다. 이것은 elicitor를 투여하지 않았을 때와 같은 결과이다. 알칼로이드 생성에 있어서도 elicitor 없었을 때와 같이 저농도(1mg tyramine/g FCW 이하)에서 알칼로이드 생성 증가를 나타내었고 0.5mg/g FCW에서 최대 알칼로이드 생성 증가를 나타내었다. Elicitor를 주입하지 않은 것과 마찬가지로 tyramine의 투입량을 증가시킬수록 pH는 증가하여 tyramine이 100mg/g FCW일 때 pH는 약 9.7까지 증가하였다. Berberine을 생성하는 *T. rugosum*의 경우 elicitor를 투여하였을 때 tyramine의 경우 12시간 이내에 상당한 양의 변화를 보고하고 있는데 (21) 이로 볼 때 배양세포와 tyramine, 그리고 elicitor와의 최적 접촉시간에 대한 연구가 더 수행되어야 하겠다.

L-Dopa 투여시 elicitor의 영향

Exponential phase 말기의 캘리포니아 양귀비 현탁세포에 효모 추출물 elicitor 80 μ g/g FCW과 다른 양의 dopa를 주입한 후 36시간 후에 샘플하였다. Fig. 8는 elicitor를 투여하였을 때 dopa 투여농도가 세포성장 및 알칼로이드 생성량에 미치는 영향을 나타내었다. 그 결과 elicitor를 함께 투여하였을 때 dopa 투여에 의해 FCW는 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 알칼로이드 생성에 있어서도 dopa 투입량을 증가시킬수록 알칼로이드 생성 증가를 나타내었고, 20mg dopa/g FCW에서 최대 알칼로이드 생성증가를 나타내었다. Elicitor를 주입하지 않은 것이 대조구(무처리)의 약 168% 알칼로이드가 증가한 반면 elicitor를 주입한 것은 대조구(elicitor만 주입)의 277% 알칼로이드 증가를 나타내었다.

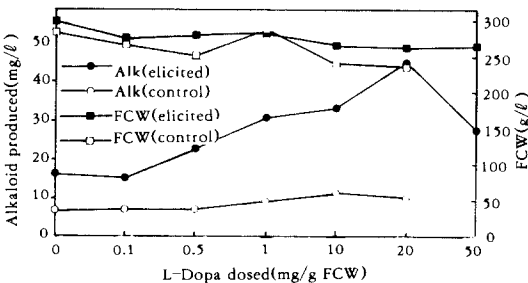


Fig. 8. Effect of L-dopa feeding with elicitation on cell growth and alkaloid production in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*.

Tyrosine 투여시 elicitor의 영향

Exponential phase 말기의 현탁세포에 효모 추출물 elicitor 80 μ g/g FCW와 다른 양의 tyrosine을 투여한 후 36시간 후에 샘플하였다. Fig. 9는 elicitor를 투여하였을 때 tyrosine 투여농도가 세포성장 및 알칼로이드 생성량에 미치는 영향을 나타내었다. 그 결과 tyrosine 투여에 의해 FCW는 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났고, 알칼로이드 생성은 elicitation 없었을 때와 같이 tyrosine 투여농도의 증가에 의해 증가하였고 5mg tyrosine/g FCW에서 최대 알칼로이드 생성 증가를 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때 캘리포니아 양귀비 현탁배양 세포에 적당량의 전구체를 투여할 때 이차대사산물은 대조구에 비해 증가한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 이 결과만 갖고 알칼로이드 생성 증가 원인을 전구체가 최종 산물로 전환되었기 때문이라고 판단하기에는 상당히 미비한 점이 많다. 오히려 전구체가 abiotic elicitor로써 작용하였기 때문에 증가한 것이라 생각할 수도 있다. 그러나 이와 같은 의문점은 yeast elicitor를 전구체와 함께 첨가해 줌으로써 biotransformation도 있다는 가능성을 높게 해주었다. 즉, elicitor는 현탁세포의 이차대사에 관여하는 효소의 전사, 해독을 유도하는 데 이와 같이 증가된 이차대사 관련 효소는 세포 내부와 외부에서 공급된 전구체를 최종산물로 전환시킴으로써 결국 이차대사산물의 생성을 촉진시킨 것이라 생각된다. 아직 biotransformation의 정확한 메커니즘은 밝혀져 있지 않으나 확실한 것은 전구체 단독으로 투여하는 것보다는 yeast elicitor와 같은 촉진제를 동시에 투여하는 것이 최종 산물의 생성을 증가시킬 수 있다는 것이다. 이것은 향후 식물세포 배양의 산업화에 유용하게 이용될 것이다.

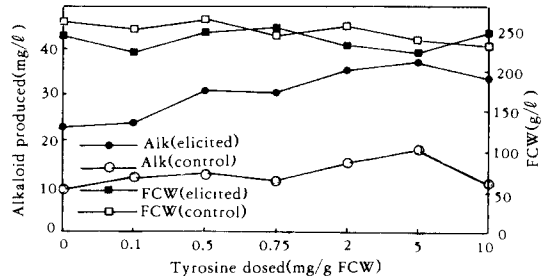


Fig. 9. Effects of tyrosine feeding with elicitation on cell growth and alkaloid production in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*.

요 약

본 연구에서는 캘리포니아 양귀비(*Eschscholzia californica*) 현탁배양세포의 주요 이차대사산물인 benzophenanthridine alkaloid의 생성을 증가시키기 위해 생합성 전구체인 tyrosine, tyramine, dopamine 그리고 L-dopa를 exponential phase 말기에 투여하였다. 그리고 이때 yeast elicitor와 전구체를 동시에 투여한 것과 비교하여 보았다. 그 결과 적당량의 전구체 투여시 benzophenanthridine alkaloid의 생성은 대조구(무처리)에 비해 증가하였다. 그리고 elicitor와 전구체를 동시에 투여해 주었을 때 대조구(elicitor만 처리)에 비해 상당히 증가하였는데, 이것은 elicitor에 의해 유도된 이차대사 관련 효소에 의해 전구체의 biotransformation이 촉진된 것이라 생각된다. 이와 같이 전구체 투여에 의해 이차대사산물의 생성을 증가시키려 할 때 전구체만 투여하는 것보다는 촉진제를 동시에 투여함으로써 최종산물의 생성을 극대화시킬 수 있으리라 생각되며, 식물세포배양의 산업화에 유용하게 이용되리라 생각된다.

감 사

본 연구는 서울대학교 농업생물신소재연구센터의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. J. Berlin, E. Forche, V. Wray, J. Hammer and W. Hosel(1983), *Z. Naturforsch.*, **38c**, 346.
2. M. A. Collinge and P. E. Brodelius(1989), *Phytochemistry*, **28**, 1101.
3. G. A. Cordell(1981), Introduction to Alkaloids(A. Geoffrey, eds), 509-517, *John Wiley & Sons*, New York.
4. G. Southard, R. T. Walborn, D. R. Boulware, W. J. Groznik, E. E. Thorne and S. L. Yankell(1984), *J. Am. Dental Assoc.*, **108**, 338.
5. C. A. Hay, L. A. Anderson, M. F. Roberts and J. D. Phillipson(1986), *Plant Cell Reports*, **5**, 1.
6. S. Koul, A. Ahuja, and S. Grewal(1983), *Planta Medica*, **47**, 11.
7. O. P. Sahai and M. L. Shuler(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 111.
8. B. Deus and M. Zenk(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1965.
9. R. J. Robins, A. B. Hanley, S. R. Richards, G. R. Fenwick and M. J. C. Rhodes(1987), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **9**, 49.
10. E. Leete(1963), *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 473.
11. E. Leete and S. J. B. Murrill(1964), *Tetrahedron Lett.*, **3**, 147.
12. N. Takao, M. Kamigauchi and M. Okada (1983), *Helv. Chim. Acta*, **66**, 473.
13. U. Eilert, W. Kurtz and F. Constabel(1987), *Plant Tissue and Cell Culture*(C. E. Green, eds), 213-219, Alan R. Liss, Inc., New York.
14. O. L. Gamborg, R. Miller and K. Ojima (1968), *Exp. Cell. Res.*, **50**, 151.
15. M. G. Hahn and P. Albershein(1981), *Plant Physiol.*, **67**, 768.
16. C. François, R. D. Marshall and A. Neuberger(1962), *J. Biochem. J.*, **83**, 335.
17. S. Y. Byun, H. Pedersen and C. K. Chin (1990), *Phytochemistry*, **29**(10), 3135.
18. T. Hattori and Y. Ohta(1985), *Plant Cell Physiol.*, **26**, 1101.
19. I. A. Marques and P. E. Rodelius(1988), *Plant Physiol.*, **88**, 46.
20. S. Y. Byun, H. Pedersen and C. K. Chin (1990), *Biochemical Engineering VI*,(W. E. Goldstein, D. Dibiasio and H. Pedersen eds.), **589**, 54.
21. K. Gugler, C. Funk and P. Brodeius(1988), *J. Biochem.*, **170**, 661.