

갈퀴꼭두선이의 Hairy Root 배양에 의한 Anthraquinone계 색소생산 연구(II)

신승원* 김유선

덕성여자대학교 약학대학

Production of Anthraquinone Derivatives by Hairy Roots of *Rubia cordifolia* var. *pratensis*

Seung-Won Shin* and You-Sun Kim

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract - Hairy roots induced from stems of *Rubia cordifolia* var. *pratensis* were cultured in the liquid medium under a variety of auxins to find the optimal condition for the growth and production of pigments. Culture of the hairy roots on NN liquid medium containing NAA 0.5 mg/l was best for growth of hairy roots. Production of yellow anthraquinone derivatives and purpurin in hairy roots was enhanced by the culture on NN liquid medium without auxins. Effects of L-phenylalanine, L-tyrosine and juglone, synthesized via the shikimic acid pathway, on growth and production of pigments in hairy roots were studied in the present study. Concentration of exogeneous L-phenylalanine, L-tyrosine and juglone in liquid culture system of hairy root containing NAA 0.1 mg/l was decreased quickly in its early stages of the culture period. Addition of juglone to NN liquid medium containing NAA 0.1 mg/l enhanced the productivity of pigments in hairy roots.

Key words - *Rubia cordifolia* var. *pratensis*; hairy root; NAA; L-phenylalanine; L-tyrosine; juglone.

갈퀴꼭두선이(*Rubia cordifolia* var. *pratensis* Max.)는 Rubiaceae에 속하는 다년생 만초로 옛부터 통혈, 지혈, 노혈, 기관지염 등에 주로 사용되어왔으며 꼭두선이(*Rubia akane*)와 함께 중요한 천연 염료자원으로 사용되고 있다. 주색소성분은 *Rubia*속 식물의 뿌리에 함유된 anthraquinone 유도체인 alizarin, purpurin, xanthopurpurin, munjistin, pseudopurpurin 및 lucidine-etherlether 등이며 anthraquinone glycoside인 ruberythric acid도 존재한다.¹⁻⁵⁾ *Rubia*속 식물에서 생산되는 anthraquinone 유도체는 polyketide pa-

thway를 거쳐 생합성되는 emodin형 anthraquinone 유도체와는 달리 shikimic acid에 α -ketoglutaric acid가 결합하여 σ -succinylbenzoic acid가 생성되고 이에 mevalonic acid가 결합하여 anthraquinone 유도체를 생산하는 shikimic acid pathway를 거쳐 생합성된다.⁶⁻¹¹⁾

저자 등은 갈퀴꼭두선이 세포에서의 효율적이고 안정적인 색소생산을 위한 연구의 일환으로 갈퀴꼭두선이 세포에 *A. rhizogenes* A₄ 및 15834의 Ri plasmid를 도입하여 hairy root를 유도하고 유도된 hairy root를 여러 가지 배양조건에서 배양하여 그의 색소 생성능을 높일 수 있는 배양조건을 검토하여 보고한 바 있다.¹²⁾ 전보에 이어 저자 등은 갈퀴

*교신저자 : Fax 02-901-8386

꼭두선이에서 유도된 hairy root 중 안정한 성장속도를 나타내는 cell line을 선별하여 액체배양을 실시하였으며 액체배양시 식물생장조절제가 hairy root의 성장속도 및 색소생성량에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. 또한 갈퀴꼭두선이세포에서 생산되는 anthraquinone 유도체와 같은 생합성 경로에 관여하는 기본아미노산인 L-phenylalanine 및 L-tyrosine¹³⁾을 배지내에 첨가하여 hairy root와 함께 배양함으로써 그 성분들이 갈퀴꼭두선이세포의 색소생성량에 미치는 영향에 대하여 검토하였고 shikimic acid로 부터 합성된 chorismic acid에 α -ketoglutaric acid가 결합하여 생성된 o-succinylbenzoic acid를 거쳐 생합성되는 juglone¹⁴⁾을 hairy root와 함께 배양하여 이 물질이 갈퀴꼭두선이에서 shikimic acid pathway를 거쳐 합성되는 anthraquinone 유도체의 생합성에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

Agrobacterium rhizogenes에 의한 갈퀴꼭두선이 세포의 형질전환 - 덕성여대 약초원(상계동)에 야생하는 갈퀴꼭두선이 *Rubia cordifolia* var. *pratensis*의 열매를 받아서 키친 후 전보와 같은 방법으로 *Agrobacterium rhizogenes* A₄로 형질전환시켜 유도된 hairy root를 NAA 0.1 mg/l첨가 Nitsch & Nitsch 고체배지(NNN 고체배지)에서 계대배양하여 그 중 안정한 성장속도를 나타내는 cell line을 선별하여 NAA를 0.1 mg/l첨가한 NN액체배지(NNN액체배지)를 기본배지로 하여 NNN고체배지와 같은 배양조건에서, 100±10 rpm으로 회전진탕 배양하였으며 3주 간격으로 계대배양하였다.

색소 생성량의 측정 - Hewlett Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer를 사용하여 alizarin 및 purpurin 표준품의 ethanol 용액의 UV-visible spectrum을 350-600 nm에서 연속으로 측정한 후 alizarin-ethanol 용액은 434 nm, purpurin-ethanol 용액은 516 nm에서 각 농도에 따른 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였고 또한 alizarin-ethanol 용액에 동량의 1N NaOH 용액을 가한 용액은 572 nm에서 각 농도에 따른 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다. 배양

중인 hairy root를 채취하여 무게를 달고 유발에서 ethanol과 함께 갈아서 여과한 후 그 여액을 취하여 516nm에서 흡광도를 측정하여 hairy root에서 생성되는 anthraquinone 유도체 중 purpurin의 생성량으로 하였으며 434 nm에서 흡광도를 측정하여 적색(최대흡광치 516 nm)을 나타내는 purpurin을 제외하고 alizarin, lucidin-ethylether 및 ruberythric acid와 같이 황색을 나타내는 성분들을 포함하는 총황색색소의 생성량으로 하였으며 이 ethanol 추출액에 동량의 1N NaOH용액을 가하여 572 nm에서 흡광도를 측정하여 총황색색소 중 alizarin의 생성량으로 하였다.

배지내 성장조절물질의 첨가가 hairy root의 성장속도 및 색소 생성량에 미치는 영향 - NNN액체배지에서 계대배양 중인 hairy root를 취하여 NAA 0.1 mg/l, NAA 0.5 mg/l 및 IAA 0.1 mg/l 각각을 첨가한 NN액체배지에서 4주간 배양하였으며 배양 후 12일째 부터 4일 간격으로 hairy root의 무게를 측정하고 배양 후 28일째 hairy root를 채취하여 색소성분을 추출한 후 흡광도를 측정하여 성장조절물질을 첨가하지 않은 NN액체배지에서 같은 기간동안 배양한 hairy root와 비교하였다.

배양액 중에 첨가된 L-phenylalanine 및 L-tyrosine의 변화실험 - L-phenylalanine 및 L-tyrosine을 NNN액체 배지에 10 mg/l의 농도로 첨가하여 NNN액체 배지에서 배양한지 2주된 hairy root와 함께 6일 동안 25°C, 암상태에서 배양하면서 1일 간격으로 배양액을 채취하여 Hitachi사의 L-8500A High Speed Amino Acid Analyzer를 이용하여 Table I과 같은 조건으로 배지내에 존재하는 L-phenylalanine 및 L-tyrosine의 농도를 측정하였다.

배양 후 6일 째 되는 날 hairy root를 채취하여 무게를 측정한 다음 hairy root의 색소성분을 추출한 후 흡광도를 측정하여 색소생성량으로 하였으며 L-phenylalanine 및 L-tyrosine을 첨가하지 않은 NNN액체배지에서 같은 조건으로 배양한 hairy root에서 생성된 색소생성량과 비교하였다.

배양액 중에 첨가된 juglone의 변화실험 - Hewlett Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer를 사용하여 juglone 표준품(Sigma)의 ethanol 용액의 UV-visible spectrum을

Table I. Analytical conditions of amino acids

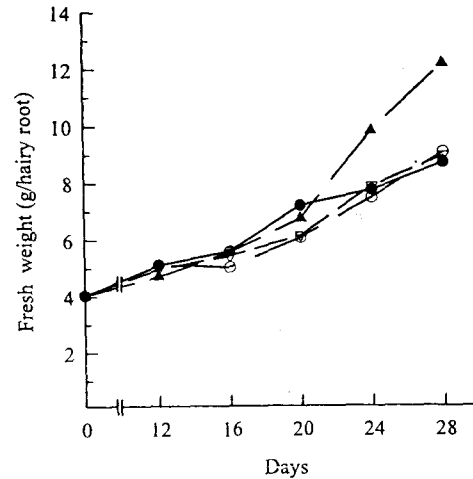
column	4.6 mm ID×60 mm (packed Hitachi custom ion exchange resin # 2622 SC)
column temperature	57°C
reaction temperature	130°C
channel	CH1 570 nm CH2 440 nm
pressure	P1 200-0 kg/cm ² P2 50-0 kg/cm ²
buffer change steps	5 steps
buffer flow rate	P1 0.40 ml/min P2 0.35 ml/min

350-600 nm에서 연속으로 측정 한 후 juglone-ethanol 용액의 각 농도에 따른 흡광도를 424 nm에서 측정하여 검량선을 작성하였다.

NN액체배지 100 ml에 juglone 2 mg 및 3 mg을 각각 첨가하여 NNN액체배지에서 기본조건으로 배양한 지 2주 된 hairy root와 함께 25°C, 암 상태에서 8시간 동안 배양하면서 1시간 간격으로 배양액을 채취하여 424 nm에서 흡광도를 측정하였고 juglone을 첨가한 배지내에서 배양한 hairy root의 색소생성량을 juglone을 첨가하지 않은 배지에서 배양한 hairy root와 비교하였다.

결과 및 고찰

배지내 성장조절제의 첨가가 hairy root의 성장속도 및 색소 생성량에 미치는 영향 - 일반적으로 *Agrobacterium*균에 의하여 형질전환 된 crown gall이나 hairy root의 배양에 있어서는 배지내에 식물성장조절제를 첨가하지 않아도 빠른 성장을 나타낸다.⁵⁻¹⁷⁾ 그러나 Knoppe 등¹⁸⁾은 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해 Solanaceae식물로 부터 유도된 hairy root의 배양시 배양도중 hairy root의 색깔이 갈변하면서 생장이 정지될 때 10⁻⁶ M IBA로 처리하면 그러한 root들의 성장을 촉진할 수 있었다고 보고하였다. 또한 Yoshikawa 등¹⁹⁾은 *Panax ginseng*의 hairy root를 IBA와 함께 배양하여 saponin의 함량을 일반 callus 및 일반 배양 세포로부터 얻어진 root에 비하여 각각 2.85배 및 1.98배정도 증가시킬 수 있었다. Sato 등²⁰⁾은 IAA 및 NAA 각각을 배지내에 첨가하여 *Rubia tinctoria*

**Fig. 1.** Effect of auxins on the growth of hairy root cultured in NN liquid medium.

- NN liquid medium without auxin
- containing NAA 0.1 mg/l
- ▲ containing NAA 0.5 mg/l
- ▽ containing IAA 0.1 mg/l.

에서 유도된 hairy root를 배양한 결과 hairy root의 성장속도 및 anthraquinone 유도체의 생성을 증가시킬 수 있었다. 이와 같이 hairy root 배양시 성장조절제의 첨가가 hairy root의 성장 및 이차대사산물의 생성에 stimulator로 작용하는 경우가 보고되고 있다.

갈퀴꼭두선이 세포에서 유도된 hairy root의 액체배양시 성장조절제가 미치는 영향에 대하여 검토해보기 위하여 NAA를 0.1 mg/l 첨가한 NN액체배지를 기본배지로 하여 성장조절제가 들어 있지 않은 NN액체배지 및 NAA를 0.5 mg/l, IAA를 0.1 mg/l의 농도로 각각 첨가한 NN액체 배지에서 hairy root를 배양하였을 때 배양 후 20일 까지는 성장조절제를 첨가하여 배양한 것과 성장조절제를 첨가하지 않고 배양한 것에서 큰 차이를 나타내지 않았으나 20일 이후에는 NAA를 0.5 mg/l 첨가한 배지에서 배양한 hairy root의 성장속도가 크게 증가되어 28일 배양 후에는 생중량이 배양초기 중량의 약 3배의 증가를 나타내었다(Fig. 1). 28일 동안 배양한 후에 hairy root로부터 생성된 색소 생성량을 비교해본 결과 NAA를 0.5 mg/l 첨가하여 배양한 경우에 hairy root에서 생성된 색소량은 가장 낮았으며 성장조절제를 첨가하지 않고 배양하였을 때 가장 높은 색소생성량을 나타내었다. 성장조절제를 첨가

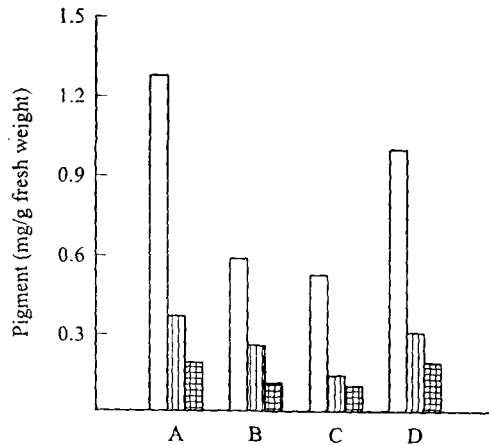


Fig. 2. Production of pigments in hairy root cultured in NN liquid medium for 28 days.

- A: NN liquid medium
 B: containing NAA 0.1 mg/l
 C: containing NAA 0.5 mg/l
 D: containing IAA 0.1 mg/l
 □ yellow anthraquinone derivatives
 ▨ purpurin ■ alizarin

하지 않았을 때의 총황색색소 및 purpurin의 hairy root g당 생성량은 각각 1.28 mg 및 0.37 mg을 나타냈으며 총황색색소가 purpurin에 비하여 약 3.4 배정도 많이 생성되었다. 그러나 성장조절을 첨가하지 않은 조건에서의 alizarin의 생성량은 0.19 mg으로 IAA로 처리하였을 때의 생성량과 같았다(Fig. 2).

이상의 결과는 Deno 등²¹⁾이 행한 *Duboisia myoporoides*의 hairy root 배양에서 NAA가 cell yield에 stimulator로 작용하나 이차대사산물의 생성에는 inhibitor로 작용한다는 연구 결과와 유사하게 나타났다.

배지내 L-phenylalanine 및 L-tyrosine첨가가 hairy root의 성장속도 및 색소 생성량에 미치는 영향-L-phenylalanine 및 L-tyrosine은 식물체내에서 anthraquinone 유도체와 마찬가지로 shikimic acid pathway를 통하여 생합성된다.²²⁾ L-phenylalanine 및 L-tyrosine의 생합성경로는 D-erythrose-4-phosphate와 phosphoenol pyruvate가 결합하여 3-deoxy-D-arabinoheptulosonic acid 7-phosphate(DAHP)가 합성되고 DAHP로부터 shikimic acid를 거쳐 chorismic acid가 합성된 후 이로부터 prephenic acid를 거

쳐 L-phenylalanine 및 L-tyrosine이 생합성된다.^{23,24)} Shikimic acid pathway의 첫 번째 단계인 D-erythrose-4-phosphate로부터 DAHP가 합성되는 단계에는 3-deoxy-D-arabinoheptulosonic acid 7-phosphate(DAHP) synthase가 관여하며 chorismic acid로부터 prephenic acid가 합성되는 경로에는 chorismate mutase가 관여한다. Cauliflower head 및 mung bean seedling으로부터 DAHP synthase 및 chorismate mutase를 분리하여 식물체내에서 L-phenylalanine 및 L-tyrosine이 그들 효소에 미치는 activity를 실험한 결과 L-phenylalanine 및 L-tyrosine은 DAHP synthase에 대하여 전혀 activity를 나타내지 않았으나 chorismate mutase에 대하여는 inhibition activity를 나타내었다는 연구보고가 있다.²⁵⁻²⁹⁾ 한편 갈퀴꼭두선이에서 생성되는 anthraquinone 유도체의 중간대사산물인 o-succinylbenzoic acid는 α -ketoglutaric acid에 shikimic acid, chorismic acid 또는 prephenic acid가 결합되어 생합성된다.⁶⁾ 외부에서 가해진 L-phenylalanine 및 L-tyrosine으로 인한 feed back control에 의하여 식물체내에서 shikimic acid로부터 L-phenylalanine 및 L-tyrosine으로의 합성이 억제되면 식물체내에 존재하는 chorismic acid가 증가되어 o-succinylbenzoic acid가 증가됨으로써 anthraquinone 유도체의 생합성을 자극할 수 있을 것으로 추정되어 anthraquinone 유도체의 생합성에 대한 L-phenylalanine 및 L-tyrosine의 영향에 대하여 검토하였다.

L-phenylalanine 및 L-tyrosine 10 mg/l를 NNN액체배지에 각각 첨가하여 hairy root와 함께 배양하면서 배지 내에서의 L-phenylalanine 및 L-tyrosine의 농도변화를 측정된 결과 L-phenylalanine 및 L-tyrosine 모두 배양 후 24시간 만에 급격한 감소를 나타내어 L-phenylalanine은 초기 투여량의 15%, L-tyrosine은 초기투여량의 약 12%만이 배지내에 존재하였다. 그러나 24시간 이후에 배지내에 존재하는 L-phenylalanine의 농도가 점차적으로 다시 증가하기 시작하였으며 L-tyrosine을 첨가한 경우에는 시간이 경과할수록 L-tyrosine의 양은 감소하였지만 L-phenylalan-

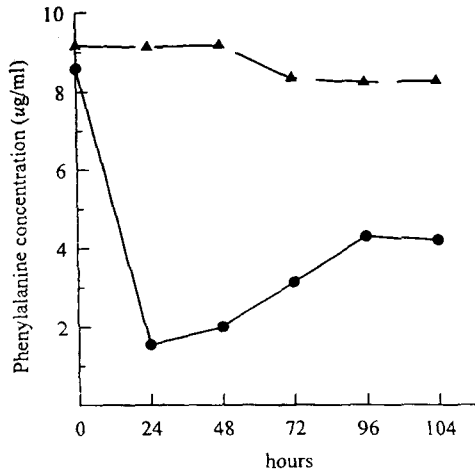


Fig. 3. Time course of phenylalanine consumption in NNN liquid medium added with phenylalanine.

● with hairy root ▲ without hairy root.

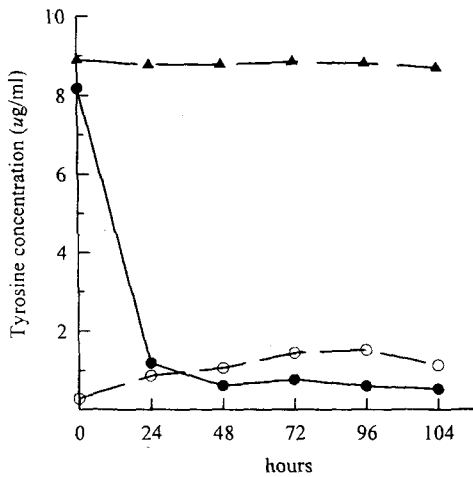


Fig. 4. Time course of tyrosine consumption in NNN liquid medium added with tyrosine.

● tyrosine, with hairy root
 ▲ tyrosine, without hairy root
 ○ phenylalanine in liquid medium added with tyrosine and hairy root.

ine의 농도는 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 3, 4). 배지내에 존재하는 L-phenylalanine 및 L-tyrosine의 농도변화는 배지에 첨가된 거의 모든 양의 L-phenylalanine 및 L-tyrosine이 배양초기에 식물체내로 흡수되고 난 후 다시 식물체의 대사결과 배출되는 L-phenylalanine의 증가로 인한 것으로 추정할 수 있었다. 배양 후 6일 후의 hairy

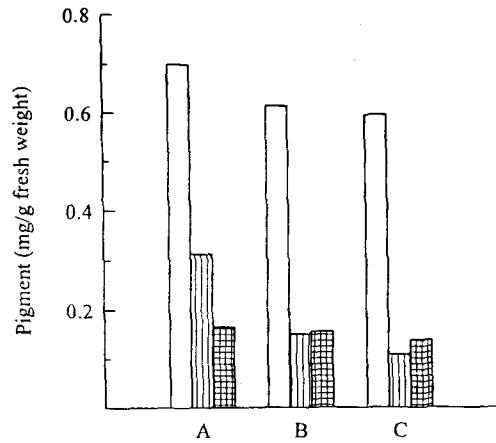


Fig. 5. Effect of amino acids on the production of pigments in hairy root cultured in NNN liquid medium.

A: NNN medium
 B: containing tyrosine 10 mg/l
 C: containing phenylalanine 10 mg/l.
 □ yellow anthraquinone derivatives
 ▨ purpurin ■ alizarin

root에서 생성된 색소량을 비교한 결과 L-phenylalanine 및 L-tyrosine을 첨가한 경우 기본배지인 NNN액체배지에서 배양한 것에 비하여 생성된 색소량은 낮았으며 기본배지에서 배양한 경우 alizarin의 생성량보다 purpurin의 생성량이 높았으나 L-phenylalanine 및 L-tyrosine을 첨가하여 배양하면 purpurin의 생성량보다 alizarin의 생성량이 더 증가되었다(Fig. 5).

이상의 결과로 볼 때 갈퀴꼭두서니의 세포배양에서 외부로부터 가해진 L-phenylalanine 및 L-tyrosine이 이차대사산물의 생합성에 영향을 미치는지 혹은 세포생장을 위한 일차대사를 위하여 사용되는지에 대하여는 앞으로의 연구가 더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

시간에 따른 juglone의 농도변화 및 hairy root의 색소생성량에 미치는 영향 - 같은 식물체내에 naphthalene 유도체와 anthraquinone 유도체가 함께 존재하며 대부분의 경우 naphthalene 유도체에는 isoprene unit가 결합되어 있으므로 이 prenylated naphthalene의 ring closure로 인하여 anthraquinone 유도체의 ring system이 이루어질 수 있다는 가정하에 anthraquinone 유도체의 생합성 경로에 대한 연구가 이루어 졌다. 또

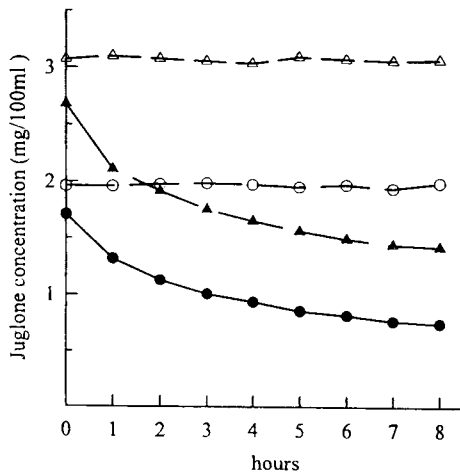


Fig. 6. Time course of juglone consumption in NNN liquid medium added with juglone.

- juglone 2 mg/100 ml. with hairy root
- ▲ juglone 3 mg/100 ml. with hairy root
- juglone 2 mg/100 ml. without hairy root
- △ juglone 3 mg/100 ml. without hairy root.

한 alizarin 생합성과정 중 1,4-naphthoquinone 이 중간물질로 작용할 수 있는지 알아보기 위하여 radioactively labeled 1,4-naphthoquinone을 alizarin을 생합성하는 *Rubia*속 식물에 투여한 결과 alizarin 생합성 과정 중에 1,4-naphthoquinone이 비대칭적으로 incorporation되어 alizarin으로 전환된다는 보고가 있다.⁷⁾

그러므로 *Juglans regia*에서 쉽게 얻을 수 있고 shikimic acid로부터 합성된 chorismic acid에 α -ketoglutaric acid가 결합하여 생성된 o-succinylbenzoic acid를 거쳐 생합성되는 1,4-naphthoquinone유도체인 juglone³⁰⁾이 *Rubia*속 식물에 존재하는 anthraquinone 유도체의 생합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 액체배지내에 juglone을 첨가하여 hairy root와 함께 배양한 결과 시간이 지남에 따라 배지내 juglone의 농도가 감소하였으며 배양한지 2시간이 지났을 때 각각 34% 및 28%의 높은 감소율을 나타내었다(Fig. 6). juglone을 2 mg/100 ml의 농도로 배지내에 첨가하여 hairy root와 함께 배양한 결과 juglone을 첨가하지 않은 기본배지에 비하여 총황색색소는 19%, alizarin은 26%의 증가를 각각 보였으며 배지내에 juglone을 3 mg/100 ml 첨가한 경우에는 기본배지에 비하여 총황색색소는 15%, alizarin은 36%,

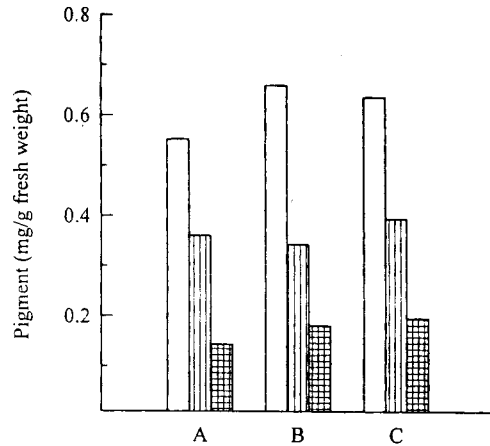


Fig. 7. Effect of juglone on the production of pigments in hairy root cultured in NNN liquid medium.

- A: NNN liquid medium
- B: containing juglone 2 mg/100 ml
- C: containing juglone 3 mg/100 ml.
- yellow anthraquinone derivatives
- ▨ purpurin
- alizarin

purpurin은 9.4%의 증가를 나타냈다(Fig. 7).

이 결과로 juglone이 hairy root의 세포내로 흡수되어 갈퀴꼭두선이세포에서 생성되는 alizarin 및 purpurin 등의 색소 생합성 과정에 관여하는 것으로 추정할 수 있었고, 이에 대한 mechanism은 확인되지 않았으나 알려진 생합성과정으로 미루어 juglone의 o-succinylbenzoic acid로의 feed back reaction의 결과일 가능성이 클것으로 예상된다.

결론

Agrobacterium rhizogenes A₄에 의하여 갈퀴꼭두선이 세포로부터 형질전환된 hairy root를 각종 조건에서 배양하여 비교한 결과, Nitsch & Nitsch 배지에 NAA 0.5 mg/l를 첨가하여 배양하였을 때 hairy root의 성장속도가 가장 높았으며 총황색색소 및 purpurin의 생성량은 성장조절을 첨가하지 않고 배양하였을 때 가장 높은 색소생산성을 나타내었다.

L-phenylalanine, L-tyrosine의 배지내 첨가는 hairy root의 성장속도 및 총황색색소량을 증가시켰으며, juglone은 단위무게당 색소생성량만을 증가시켰다. L-phenylalanine, L-tyrosine 및 ju-

glone의 배지 내에서의 시간당 변화를 측정 한 결과 배양초기에 빠른 감소를 나타냈다.

인용문헌

1. Itokawa, H., Mihara, K. and Takeya, K. (1983) Studies on novel anthraquinone and its glycosides isolated from *Rubia cordifolia* and *R. akane*. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 2353-2358.
2. Varma, N., Painuly, P., Sharma, S. C. and Tandon, J. S. (1985) A new anthraquinone glycoside from *Rubia cordifolia*. *Indian Journal of Chemistry* 24B: 791-792.
3. Kawasaki, Y., Goda, Y. and Yoshihira, K. (1988) Anthraquinones from *Rubia tinctorium*. *Shoyakugaku Zasshi* 42: 166-167.
4. Suzuki, H., Matsumoto, T. and Obi, Y. (1982) Anthraquinone in cell suspension cultures of *Rubia cordifolia* L. var. *mungista* Miq. *Plant Tissue Culture*: 285-286.
5. Kawasaki, Y., Goda, Y., Sato, K. and Toshihira, K. (1989) Studies on coloring constituents in commercial madder color. *Bulletin of National Institute of Health Sciences*. 107: 103-104.
6. Leistner, E. (1973) Mode of incorporation of precursors into alizarin(1,2-dihydroxy-9,10-anthraquinone). *Phytochemistry* 12: 337-345.
7. Stumpf, P. K. and Conn, E. E. (1981) The Biochemistry of Plants, vol. 7, 411-423, Academic Press, New York.
8. Koblitz, H. (1988) Anthraquinones. In Constabel, F. and Vasil, I. K. (eds.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, vol. 5, 113-139. Academic Press, San diego.
9. Bauch, H. J. and Leistner, E. (1978) Aromatic metabolites in cell suspension cultures of *Gallium mollugo* L. *Planta Medica* 33: 105-123.
10. Wilson, G. and Balague, C. (1985) Biosynthesis of anthraquinone by cells of *Gallium mollugo* L. grown in a chemostat with limiting sucrose or phosphate. *Journal of Experimental Botany* 36: 485-493.
11. Inoue, K., Shiobara, Y., Nayeshiro, H., Inouye, H., Wilson, G. and Zenk, M. H. (1984) Biosynthesis of anthraquinones and related compounds in *Gallium mollugo* cell suspension cultures. *Phytochemistry* 23: 307-311.
12. Shin, S. H. and Kim, Y. S. (1996) Production of anthraquinone derivatives by *Rubia cordifolia* var. *pratensis* by *Agrobacterium rhizogenes*. 덕성여대논문집, 613-625.
13. 奥田拓男編 (1990) 薬用天然物化学, 5-9. 廣川書店, 東京.
14. 三橋博, 田中治, 野副重男, 永井正博 (1985) 天然物化学, 187-196. 南江堂, 東京.
15. Yang, D. C., Kim, Y. H., Kwon, J. N., Choi, C. H. and Yang, D. C. (1995) Effects of light on activities of antioxidative enzymes in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. *Korean J. Plant Tissue Culture* 22: 71-76.
16. Tepfer, D. (1984) Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37: 959-967.
17. Ryder, M. H., Tate, M. E. and Kerr, A. (1985) Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surface of carrot root discs. *Plant Physiol.* 77: 215-221.
18. Knopp, E., Strauss, A. and Wehrli, W. (1988) Root induction on several Solanaceae species by *Agrobacterium rhizogenes* and the determination of root tropane alkaloid content. *Plant Cell Reports* 7: 590-593.
19. Yoshikawa, T. and Furuya, T. (1987) Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 6: 449-453.
20. Sato, K., Yamazaki, T., Okuyama, E., Yoshihira, K., Shimomura, K. (1991) Anthraquinone production by transformed root cultures of *Rubia tinctorium*: Influence of phytohormones and sucrose concentration. *Phytochemistry* 30: 1507-1509.
21. Deno, H., Yamagata, H., Emoto, T., Yoshioka, T., Yamada, Y. and Fujita, Y. (1987) Scopolamine production by root cultures of *Duboisia myoporoides* H. Establishment of a hairy root culture by infection with *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Plant Physiol.* 131: 315-323.
22. Mann, J. (1994) Carbohydrates. In Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V. and Harborne, J. B. (eds.), Natural Products, 7-67. Longman Scientific & Technical, Harlow.
23. Herbert, R. B. (1981) The biosynthesis of secondary metabolites, 2nd ed., 97-104. Chapman & Hall, London.
24. 백태홍 역 (1988) 천연물화학, 73-126. 수서원, 서울.
25. Hara, Y., Laugel, T., Morimoto, T. and Yamada,

- Y.(1994) Effect of gibberellic acid on berberine and tyrosine accumulation in *Coptis japonica*. *Phytochemistry* 36: 643-646.
26. Smith, L., Ravel, J. M., Lax, S. R. and Shive, W. (1962) The control of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthesis by phenylalanine and tyrosine. *The Journal of Biological Chemistry* 237: 3566-3570.
27. Minamikawa, T. (1967) A study on 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase in higher plants. *Plant & Cell Physiol.* 8: 695-707.
28. Gilchrist, D. G., Woodin, T. S., Johnson, M. L. and Kosuge, T. (1972) Regulation of aromatic amino acids biosynthesis in higher plants I. Evidence for a regulatory form of chorismate mutase in etiolated mung bean seedlings. *Plant Physiol.* 49: 52-57.
29. Huisman, O. C. and Kosuge, T. (1974) Regulation of aromatic amino acids biosynthesis in higher plants II. 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthetase from cauliflower. *The Journal of Biological Chemistry* 249: 6842-6848.
30. Harbone, J. B. (1994) Phenolics. In Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V. and Harborne, J. B. (eds.), *Natural Products*. 361-388. Longman Scientific & Technical, Harlow.

(1996년 10월 8일 접수)