

오이조직 배양세포에 의한 Ascorbate Oxidase 생성 및 생산

이종화* · 정호권 · 新名淳吉¹ · 임번삼²

건국대학교 미생물공학과, ¹오사카대학 응용생물공학과,

²주식회사 미원 중앙연구소

Formation and Production of Ascorbate Oxidase by Cucumber Tissue Cultured Cells

Lee, Jong-Hwa*, Ho-Kwon Chung, Atsuhiko Shinmyo¹ and Bun-Sam Lim²

Department of Microbial Technology, Kon-kuk University, Seoul 133-701, Korea

¹Department of Biotechnology, Osaka University, Suita, Osaka 565, Japan

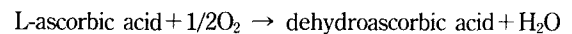
²Research and Development Center, Miwon Co., LTD., Seoul 132-020, Korea

Abstract — Ascorbate oxidase activity in various cucumber tissue extracts was highest in young fruit peeling. Cucumber callus was induced from young fruit peeling and callus cell lines were selected for more than 7 months, which produced high levels of ascorbate oxidase and had a high growth rate. Induction of callus was optimized with Linsmaier-Skoog(LS) medium at 25°C in dark phase. Ascorbate oxidase activity reached a maximum at 5 days after transfer to LS basal liquid-medium and then declined. The enzyme activity in callus cells was stimulated by addition of 10 μM CuSO₄ in the early logarithmic phase of growth. And also, adding 10 μM CuSO₄ at 3rd day and 7th day of culture period, ascorbate oxidase activity in callus cells was maintained to high level. Maximum yield of ascorbate oxidase was found at the 25th day by flask shaking culture, but three-fold of ascorbate oxidase activity was obtained at the 16th day by jar fermentation.

최근, 식물이 생산하는 유용물질을 얻는 방법으로 식물조직배양법이 널리 이용되고 있다. 이 방법은 우량세포의 선발이 가능하며, 대량배양 및 그 후의 분리, 정제가 간단하고, 배양기간이 비교적 짧아 공장규모화 할 수 있는 이점이 있다. 또한 배양세포는 환경조건과 처리한 물질의 흡수가 용이하고 균일한 무균재료를 손쉽게 얻을 수 있어 고등식물의 대사생리조사 및 물질생산 연구에 널리 사용되고 있다. 이러한 연구로는 알칼로이드(1, 2), 스테로이드(3), 비타민(4, 5), 색소(6, 7) 등과 같은 2차 대사산물의 생산에 관한 보고가 있으며, 최근에는 효소의 유도 mechanism에 관한 연구(8, 9)가 많이 보고되고 있다.

Ascorbate oxidase(EC 1.10.3.3)는 L-ascorbate : oxygen oxidoreductase라고도 하며 효소분자에 4개 이상의 구리이온을 갖고 있는 blue multicopper oxi-

dase에 속하는 효소로서(10), 식물에 다양하게 분포되어 있으며, 다음과 같은 반응을 촉매한다(11).



식물 유래의 ascorbate oxidase는 Szent-Györgyi (12)가 처음으로 *Brassica oleracea* var. *capitata*(cabbage)에서의 효소활성을 조사 보고한 이후, *Cucurbita pepo condensata*(crock-neck squash), *Cucurbita pepo medullosa*(green zucchini squash), *Cucumis sativus* (cucumber) 등에 본 효소가 존재함이 밝혀져 왔다(13). 이러한 ascorbate oxidase는 아직 정확한 생물학적 기작이 밝혀지지 않은 효소이지만 과일쥬스 등의 식품 및 임상실험에 있어서 빠르고 정확하게 ascorbic acid를 정량하는데 사용되는 중요한 효소이다(14, 15).

따라서 본 연구는 ascorbate oxidase가 함유되어 있는 오이의 각 기관조직의 효소활성을 조사하고, 고체배지상에서 무정형의 세포증식 단위인 callus를 유도한 다음, 액체배양을 통해 배양시의 경시변화,

Key words: Ascorbate oxidase, plant tissue culture, cucumber

*Corresponding author

식물성장호르몬의 영향, CuSO_4 의 영향 등 ascorbate oxidase를 안정적, 효율적으로 대량생산하기 위한 배양의 최적조건 및 효소의 생성과정을 조사하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물

본 실험에 사용한 오이는 일본산 四葉품종의 것을 사용하였다. 비닐하우스에서 재배한 오이의 각 기관을 개화 후 4일, 1주 및 2주 경과한 열매 그리고 본줄기, 가는줄기, 뿌리, 잎의 7부분으로 구분하여, 수확한 직후 -80°C 에서 저장하여 실험에 사용하였고, 오이의 callus 유도시에는 수확 후 5°C 냉장 저장하면서 2~3일 내에 사용하였다.

조효소 용액의 제조

오이의 각 기관별 시료 1g에 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)를 1 ml 첨가한 후, glass homogenizer(Ikemoto Co.) 및 Waring blender(Ikemoto Co.)를 사용하여 균질화시켰고, 오이 조직에서 유도된 callus는 glass homogenizer만을 사용하여 동일한 buffer로 균질화시켰다. Homogenate를 7,000 rpm에서 15분간 원심분리(Hitachi Co., SCR 20B)한 다음, 상등액을 여과(Toyo filter paper No. 2)하여 세포내 조효소 용액으로 사용하였다. 액체진탕배양 후의 배지는 30 μm 의 나이론포 및 여과지로 배양세포를 걸러낸 후 배지로 분비된 세포의 조효소 용액으로 사용하였다.

효소활성의 측정

Ascorbate oxidase의 활성측정은 Oberbacher 등 (16)에 의한 spectrophotometric assay 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 0.05% BSA를 포함하는 10 mM Na_2HPO_4 용액으로 희석한 조효소 용액 1.0 ml에 1.0 mM ascorbic acid 용액 0.5 ml 및 10 mM Na_2HPO_4 용액 0.5 ml를 가하여 잘 섞은 후 30°C 에서 5분 반응시켰다. 0.2 N HCl 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 spectrophotometer(Hitachi Co., U-3200)로 245 nm에서 OD값을 측정했고, 대조구로서 0.2 N HCl 3 ml를 먼저 가하여 반응을 정지시킨 후 조효소 용액을 첨가하였다. 이때 ascorbate oxidase 1 unit는 1 μM 의 ascorbic acid를 산화시키는 효소량으로 나타내었다.

Total RNA 정량

본 실험에서는 guanidine thiocyanate로 cell을 파괴하고 CsCl gradient에서 초원심분리(Hitachi Co., Automatic Preparative Ultracentrifuge 55P-72, Rotor RSP40T-437)하는 방법(17)에 의해 total RNA를 측정하였다.

식물성장배지

식물성장배지로는 LS 배지(18), White 배지(19), Nitsch 배지(20)의 3종류를 검토하였으며, 식물성장호르몬의 경우 auxin으로서 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D), α -naphthaleneacetic acid(NAA), indole-3-acetic acid(IAA)를, cytokainine으로서는 6-benzyladenine(BA), kinetin(K)을 0.1 μM ~50 μM 의 농도로 첨가하였고, 당은 sucrose를 30 g/l 첨가하였다. 각 배지는 pH 5.7~5.8로 조정 사용하였다.

Callus의 유도 및 고체배양

수확한 오이는 수도수로 2~3회 표면 세척한 후 70% ethanol에 1분, 즉시 조제한 1.0% NaClO에 5분 담가 살균하였다. 멸균증류수로 3회 세정한 후 표피부분을 $7 \times 7 \times 5$ mm 정도의 크기로 잘라, 1% agar 및 식물성장호르몬 2,4-D를 25 μM , kinetin을 0.5 μM 첨가한 배지 위에 petri dish당 6개씩 이식하여 25°C 암소에서 callus를 유도시켰다. 4주 후에 생성된 callus를 무균적으로 잘라내어 새로운 배지에 4주 간격으로 계대배양하였고, 그 일부는 ascorbate oxidase 활성을 측정하여 우량 callus cell line을 선발하였다.

액체배양

고체배양에서 유도된 callus를 300 ml 용량의 Erlenmeyer flask에 2 g fresh weight/100 ml media로 이식한 다음 실리콘마개로 봉하였다. 액체배양은 rotary shaker(Gio Gyrotory Shaker, New Brunswick Scientific Co.)를 사용하여 115 rpm, 25°C 에서 실시하였고, 약 4주 간격으로 배지 100 ml에 배양현탁액 20 ml 또는 2 g fresh weight의 배양세포를 접종하여 계대배양하였다. Jar fermentor에 의한 대량배양은 배지량 1.0 l, 교반회전수 200 rpm, 통기량 0.2 vvm, 접종량 20 g/l의 조건으로 수행하였다. 액체배양에서의 callus 중량은 공경 30 μm 의 무게를 측정된 나이론포에 배양액을 흡인 여과한 후 나이론포상의 남은 세포중량을 측정하여 fresh callus weight로 하였다.

배지중 잔당량의 측정

배지중의 잔당량의 측정은 배지에 H₂SO₄를 첨가하여 가열반응시킨 후, 생성된 furan 유도체와 phenol과의 발색반응을 490 nm에서 측정하는 phenol-H₂SO₄ 방법(21)을 사용하였다.

결과 및 고찰

기관별 ascorbate oxidase 활성 분포

오이의 각 기관별로 ascorbate oxidase 활성을 조사한 결과 개화 후 4일에 수확한 어린 열매가 가장 높게 나타났으며 늙은열매(개화 후 2주), 중간열매(개화 후 1주), 본줄기, 가는줄기는 비교적 낮은 값을 나타내었다. 또한 CsCl gradient에서 초원심분리하여 추출한 오이의 각 기관별 total RNA량은 어린열매와 잎이 큰 값을 보였으나 늙은열매와 뿌리는 비교적 작은 값을 나타내었다(Table 1). Esaka 등(22)에 의한 호박세포 액체배양 및 Cho 등(23)에 의한 오이 조직 배양에서도 ascorbate oxidase 생산을 위해 열매의 껍질 부분을 사용하였으나, 본 결과에 따르면 같은 열매 조직에 있어서도 그 숙성도에 따라 효소 생성 패턴이 다른 것으로 나타나, 효소생산을 위해서는 특히 어린열매의 표피조직으로부터 callus를 유도하는 것이 효율적인 것으로 생각된다.

Callus 유도 및 우량 callus cell line 선발

어린오이의 표피부분을 잘라 1% agar를 첨가한

고체배지에 이식하여 25°C 암소에서 배양한 결과 무성형의 세포증식 단위인 연노랑색의 callus를 얻을 수 있었다. 통상 식물조직배양에 많이 사용되는 3종의 배지에 따른 callus 유도율 및 성장속도를 비교한 결과 Table 2에서와 같이 LS 기본배지가 callus 유도에 적합하였으며, callus의 성장속도도 4주 배양시 약 5배로서 White 배지 2.8, Nitsch 배지 3.1에 비해 높은 것으로 나타났다.

유도된 callus는 ascorbate oxidase 활성이 0.3 U/g fresh weight로 유도된 오이 열매 자체(Table 2)에 비해 낮았으나, 유도된 callus를 7개월간 계대배양한 결과 성장이 빠르고 약 5배의 효소활성을 갖는 우량 callus cell line을 얻을 수 있었다.

액체배양시의 경시변화

고체배양에서 유도된 callus를 접종량 2 g fresh weight/100 ml media, 진탕회전수 115 rpm, 25°C의 조건으로 flask에서 액체배양했을 때의 세포성장과 ascorbate oxidase 활성의 경시변화를 조사한 결과 Fig. 1과 같았다. 배양세포는 완만한 성장을 보여 배양 25일경 정상기에 도달하였으며, 배지 중의 당도 거의 소모되었다. 세포내 ascorbate oxidase 활성은 배양 초기에 증가하다가 5일째 최대를 나타냈으나 그 후 서서히 감소하였다. 이는 Esaka 등(22)에 의한 호박세포의 ascorbate oxidase 형성에 관한 보고 내용과 유사한 경향을 보였다. 한편 ascorbate oxidase는 여러 식물조직에 분비 가능한 soluble form과 세포벽에 결합되어 있는 두 형태로 존재한다고 보고되어 있다

Table 1. Distribution of ascorbate oxidase activity and total RNA in various cucumber tissues

Tissues ^a	Enzyme activity ^b (U/g tissue)	Total RNA (µg/g tissue)
Old fruit	237.6	45.0
Middle fruit	312.4	61.0
Young fruit (whole)	1,260.5	182.1
Young fruit (peeling)	1,848.6	216.9
Young fruit (inner part)	517.7	130.9
Site stem	389.2	83.0
Main stem	403.7	79.5
Leaf	184.8	136.7
Root	7.5	31.6

^aThe old, middle and young fruit were harvested at 2 weeks, 1 week and 4 days after flowering.

^bOne unit of ascorbate oxidase activity was expressed as the decrease of 1 µM of L-ascorbic acid per min.

Table 2. Effect of plant cell culture media on induction ratio of callus from cucumber peeling and growth ratio of callus^a

Media	Induction ratio of callus ^b (%)				Growth ratio ^c
	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk	
White	22.2	24.4	33.3	42.2	2.8
Linsmaier-Skoog	45.6	58.9	64.4	73.3	5.1
Nitsch	27.8	41.1	47.8	48.9	3.1

^aIn order to obtain callus, cucumber peeling slices were cultured on petri dish containing LS solid agar medium at 25°C in dark phase.

^bInduction ratio=(No. of callus-induced cucumber peeling pieces/No. of total inoculated cucumber peeling pieces)×100

^cGrowth ratio=weight of callus grown for 4 weeks/weight of inoculated callus

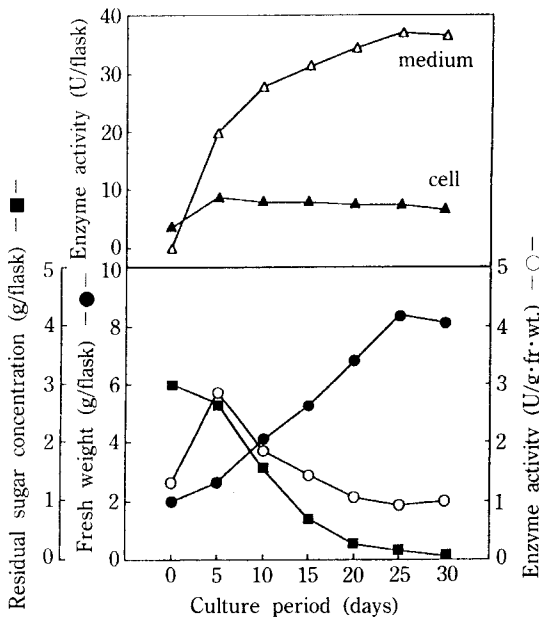


Fig. 1. Time course of cell growth, ascorbate oxidase activity and residual sugar concentration during cucumber callus culture.

About 2 g fresh callus was transferred to 100 ml LS liquid medium with 25 μ M 2,4-D and 0.5 μ M kinetin, and cultured at 25°C in dark phase. The results were expressed as mean from three flask cultures.

(24). Cho 등(23)에 의한 오이 조직배양 및 Esaka 등(22)에 의한 호박세포 액체배양의 결과에 따르면, 전체 ascorbate oxidase의 45~74%가 배지로 분비된다고 보고하였는데, 본 실험에서도 유사한 결과가 나타나 Fig. 1에서와 같이 배양 최종일에 약 80%의 효소가 배지로 분비되었다.

성장호르몬의 영향

식물성장호르몬의 배양세포의 성장과 ascorbate oxidase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 auxin을 25 μ M, cytokinin을 0.5 μ M의 농도로 첨가하여 25일간 배양한 결과 Table 3에서와 같이 2,4-D+K의 경우가 세포성장 및 효소활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 2,4-D+BA의 경우는 세포성장 및 세포내 효소활성은 높았으나 분비율이 적었으며, IAA+K 첨가시 세포성장은 활발했으나 효소활성이 낮았고, NAA+K, NAA+BA 첨가시 느린 세포성장을 보였고 IAA+BA의 경우는 효소분비를 억제하였다. 따라서 오이 배양세포의 성장에는 2,4-D가 필수적인 반면 NAA는 성장호르몬으로서 부적합한 것으로 생각되며,

Table 3. Effect of auxin and cytokinin on fresh weight and ascorbate oxidase activity of cucumber callus cultured for 25 days^a

Hormone ^b		Fresh weight (g)	Ascorbate oxidase activity		
Auxin	Cytokinin		Cell (U/g.fr.wt.)	Medium (U/flask)	Total (U/flask)
2,4-D	K	9.4	1.9	39.5	57.4
NAA	BA	6.8	0.9	23.5	29.6
IAA	K	8.3	0.8	36.7	43.3
2,4-D	BA	9.1	1.8	29.0	45.4
NAA	K	6.9	1.7	32.3	44.0
IAA	BA	8.0	1.3	16.0	26.4

^aTwo grams of cucumber callus were inoculated into 100 ml of LS medium containing 25 μ M auxin and 0.5 μ M cytokinin, and cultured at 25°C in dark phase.

^b2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, NAA: α -naphthaleneacetic acid, IAA: indole-3-acetic acid, K: kinetin, BA: 6-benzyladenine

효소분비에는 K가 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다.

이상은 Cho 등(23)에 의한 오이 배양세포의 실험 결과와 유사하나 IAA+K의 경우가 ascorbate oxidase 활성이 높았다고 한 점, 2,4-D+BA가 최대 세포성장을 보였다고 한 점 등은 본 실험과는 차이를 나타내었다. 또한 낮은 농도(5 μ M)의 2,4-D가 ascorbate oxidase 생산을 자극한다고 보고하였으나, 본 실험에서는 호르몬의 농도가 효소활성에 미치는 영향은 거의 없었으며, 고체배양에서와 같이 2,4-D가 25 μ M, kinetin가 0.5 μ M의 농도이었을 때 성장속도가 최대이었다.

CuSO₄의 영향

Ascorbate oxidase의 prosthetic metal인 구리이온의 영향을 검토한 결과, LS 기본배지의 CuSO₄ 농도 즉 0.1 μ M에서 세포성장이 가장 활발했으며, 10 μ M 첨가시 세포 중량은 약간 감소했으나 CuSO₄를 첨가하지 않았을 때에 비해 약 4배, LS 기본배지에 비해 약 2배로 ascorbate oxidase 활성이 증가하였다. 그러나 100 μ M의 고농도 첨가시 세포성장 및 효소활성에 저해작용이 있는 것으로 나타났으며(Table 4), 고농도의 Cu²⁺이온에 의한 효소활성의 저해현상은 Esaka 등(22) 및 Cho 등(23)의 보고와도 일치하였다.

한편 CuSO₄를 첨가하지 않았을 때와 10 μ M을 첨가한 경우의 배양시의 경시변화를 살펴본 결과 Fig. 2에서와 같이 배양 5일경 효소활성의 peak를 나타냈다.

따라서 오이 배양세포는 새로운 배지에서 배양초기에 활발한 효소합성을 하며 CuSO₄의 농도가 ascorbate oxidase 생성에 큰 영향을 미치는 것으로 생각되었다.

이상의 결과를 바탕으로, LS 기본배지로 배양하면서 배양 3일째와 7일째에 10 μM의 CuSO₄를 첨가하여 배양했을 때의 세포내 ascorbate oxidase 활성의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 배양 3일째 CuSO₄를 첨가한 경우에는 급격히 ascorbate oxidase 활성이 증가하였으나 배양 최종일에는 초기상태로 감소하였고 배양 7일째에 10 μM의 CuSO₄를 첨가한 경우는 약간

증가하다 감소하였다. 그러나 3일과 7일째 모두 첨가했을 때 효소활성이 증가한 후 배양 최종일까지 높은 활성을 유지하였다. 이와같이 효소활성에 CuSO₄의 농도가 중요한 역할을 하는 것은 Cu²⁺이온이 ascorbate oxidase의 안정화에 기여하기 때문인 것으로 추정된다.

Table 4. Effect of CuSO₄ concentration on fresh weight and ascorbate oxidase activity of cucumber callus cultured for 7 days^{a,b}

CuSO ₄ (μM)	Fresh weight (g)	Ascorbate oxidase activity		
		Cell (U/g.fr.wt.)	Medium (U/flask)	Total (U/flask)
0	3.7	1.5	23.2	28.8
0.01	3.5	2.0	22.5	29.5
0.1	3.8	2.8	25.9	36.5
1	3.3	3.7	25.1	37.3
10	3.4	5.6	22.0	41.0
100	2.2	2.7	23.1	29.0

^aTwo grams of cucumber callus were inoculated into 100 ml of LS medium containing 25 μM auxin and 0.5 μM cytokinin, and cultured at 25°C in dark phase.

^bSimilar results have been obtained in three independent experiment for various culture period.

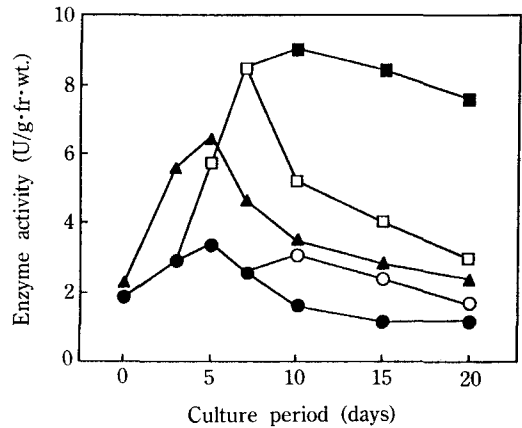


Fig. 3. Effect of CuSO₄ on ascorbate oxidase activity in cells during cucumber callus culture.

About 2 g fresh callus was inoculated into each flask containing LS medium with 10 μM CuSO₄ (—▲—) or without CuSO₄ (—●—). And also 10 μM CuSO₄ was aseptically added to LS medium without CuSO₄ at 3rd day (—□—), 7th day (—○—) or 3rd and 7th day (—■—).

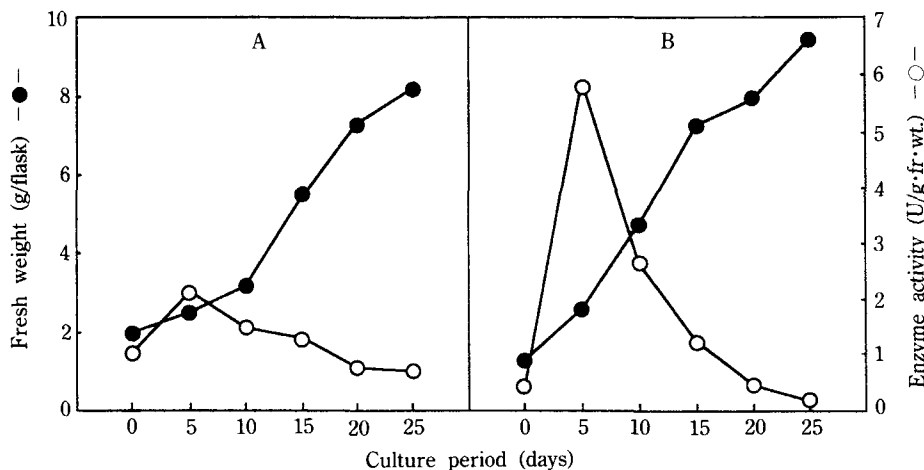


Fig. 2. Changes in ascorbate oxidase activity in cucumber callus cultured with LS liquid-medium without CuSO₄ (A) or with 10 μM CuSO₄ (B).

The cultured cells were harvested at the indicated periods, weighed and homogenized for the enzyme assay. Similar results were obtained in three independent experiments.

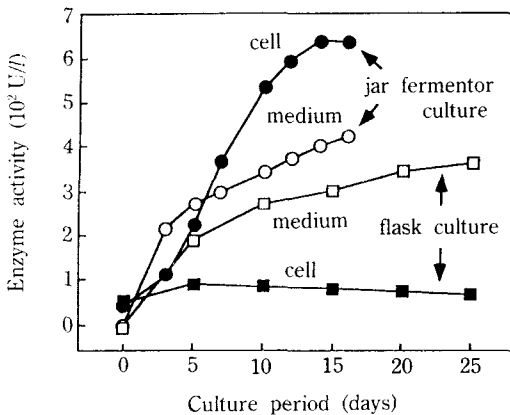


Fig. 4. Comparison of jar fermentor culture with flask culture on ascorbate oxidase activity in cucumber callus and culture medium.

Jar fermentor에 의한 배양

오이 배양세포로부터 ascorbate oxidase를 효율적으로 대량생산하기 위한 목적으로, 2,4-D 25 μ M, kinetin 0.5 μ M, CuSO_4 10 μ M를 첨가한 LS 배지로 배양하면서 3일째 및 7일째에 10 μ M의 CuSO_4 를 추가로 첨가하여 jar fermentor로 배양한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. LS 기본배지로 배양한 flask 배양과 비교하면 배양기간을 총 25일에서 16일로 단축할 수 있었으며, 식물성장호르몬 및 CuSO_4 의 첨가조건을 최적화함으로써 배지로 분비되는 효소는 물론 배양세포내의 효소활성을 증가시킬 수 있었다.

요 약

오이의 각 기관별로 ascorbate oxidase 활성을 측정하고 결과 어린열매(개화 후 4일), 특히 표피부분의 효소활성이 가장 높았으며 total RNA 함도 높게 나타났다. Callus 유도에는 LS 기본배지가 최적이었으며 어린열매의 표피부분으로부터 연노랑색의 callus를 얻을 수 있었고, 7개월간의 계대배양한 결과 초기 효소활성의 5배를 갖는 우량 callus cell line을 선발할 수 있었다.

액체진탕배양에 있어 오이 배양세포는 약 25일의 배양기간을 가지며, 세포내 효소활성은 배양초기에 증가하다가 점차 감소하였다. 오이 배양세포는 ascorbate oxidase를 배지로 분비하였으며 세포내 효소활성에 비해 약 4배 정도 높았고 분비량은 배양기간 경과에 따라 증가하였다. 식물성장호르몬으로는 2,

4-D와 kinetin이 효소생산에 적합하였다.

Ascorbate oxidase는 CuSO_4 농도에 민감한 반응을 보여, 10 μ M 첨가시 LS 기본배지에 비해 약 2배 효소활성이 증가하였다. 배양초기에 간헐적으로 10 μ M의 CuSO_4 를 첨가한 결과 세포내 효소활성이 급격히 증가하였고 배양 최종일까지 높은 활성을 유지했으나, 배지중에 분비되는 효소활성에는 큰 영향을 없었다.

이상의 결과를 바탕으로 실시한 jar fermentor 배양 결과, Erlenmyer flask를 이용한 액체진탕배양과 유사한 경향을 보였으나, 배양기간은 약 16일 정도로 단축되었으며 식물성장호르몬 및 CuSO_4 의 첨가조건을 최적화함으로써 배지로 분비되는 효소는 물론 배양세포내의 효소활성을 증가시킬 수 있었다.

감사의 말

본 연구의 일부는 미원그룹 인재육성위원회의 해외파견연수 지원계획에 의해 수행된 것이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kurz, G.W., K.B. Chatson, F. Constabel, J.P. Kutney, L.S.L. Choi, P. Kolodziejczyk, S.K. Sleigh, K.L. Stuart and B.R. Worth. 1980. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures: Initial studies on cell lines and their alkaloid content. *Phytochemistry* **19**: 2583-2587.
2. Sato, F. and Y. Yamada. 1984. High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry* **23**: 281-285.
3. Hagimori, M., T. Matsumoto and Y. Obi. 1982. Studies on the production of *Digitalis cardenolides* by plant tissue culture. *Plant Physiol.* **69**: 653-656.
4. Yamada, Y. and K. Watanabe. 1980. Selection of high vitamin B6 producing strains in cultured green cells. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 2683-2687.
5. Watanabe, K., S. Yano and Y. Yamada. 1982. The selection of cultured plant cell lines producing high levels of biotin. *Phytochem.* **21**: 513-516.
6. Fujita, Y., Y. Hara, T. Ogino and C. Suga. 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep.* **1**: 59-60.
7. Yamakawa, T., K. Ishida, S. Kato, T. Komada and Y. Minoda. 1983. Formation and identification of anthocyanins in cultured cells of *Vitis* sp. *Agri. Biol. Chem.* **47**: 997-1001.

8. Zenk, M. H., M. Rueffer, M. Amann, B. D. Neumann and N. Nagakura. 1985. Benzylisoquinoline biosynthesis by cultivated plant cells and isolated enzymes. *J. Natural Products* **48**: 725-738.
9. Kaulen, H., J. Schell and F. Kreuzaler. 1986. Light-induced expression of the chimeric chalcone synthase-NPT II gene in tobacco cells. *EMBO J.* **5**: 1-8.
10. Lee, M. H. and C. R. Dawson. 1973. Ascorbate oxidase: Further studies on the purification of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **248**: 6596-6602.
11. Weis, W. 1975. Ascorbic acid and electron transport. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **258**: 192-200.
12. Szent-Györgyi, A. 1931. On the function of hexuronic acid in the respiration of the cabbage leaf. *J. Biol. Chem.* **90**: 385-393.
13. Dawson, C. R. 1966. Ascorbate oxidase. In J. Peisach, P. Aisen and W. E. Blumberg (ed.), *A review, in the biochemistry of copper*. Academic Press, New York.
14. Matsumoto, K., K. Yamada and Y. Osajima. 1981. Ascorbate electrode for determination of L-ascorbic acid in food. *Anal. Chem.* **53**: 1974-1979.
15. Esaka, M., K. Suzuki and K. Kubota. 1985. Determination method for L-ascorbic acid in foods with immobilized ascorbate oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 2955-2960.
16. Oberbacher, M. F. and H. M. Vines. 1963. Spectrophotometric assay of ascorbic acid oxidase. *Nature* **197**: 1203-1204.
17. Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald and W. J. Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* **18**: 5294-5304.
18. Linsmaier, E. M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* **18**: 100-126.
19. White, P. R. 1963. *The cultivation of animal and plant cells*, 2nd ed. Ronald Press, New York.
20. Nitsch, C. and J. P., Nitsch. 1967. The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L.; I. The production of vegetative buds. *Planta* **72**: 355-370.
21. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smite. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
22. Esaka, M., J. Imagi, K. Suzuki and K. Kubota. 1988. Formation of ascorbate oxidase in cultured pumpkin cells. *Plant Cell Physiol.* **29**: 231-235.
23. Cho, H. J., T. Aimi, S. Y. Paik and Y. Murooka. 1989. Secretory production of ascorbate oxidase by cultured cells of cucumber. *J. Ferment. Bioeng.* **68**: 193-199.
24. Mary, H., P. D. Phethean and J. Taggart. A critical study of the intracellular distribution of ascorbate oxidase and a comparison of the kinetics of the soluble and cell-wall enzyme. *Phytochemistry* **9**: 935-944.

(Received March 13, 1993)