

## Cellulomonas sp. AP-7이 생산하는 Ascorbic Acid Phosphorylating Enzyme의 정제 및 특성

이상협 · 최현일 · 방원기\*  
고려대학교 자연자원대학 농화학과

**Purification and Characterization of Ascorbic Acid Phosphorylating Enzyme from *Cellulomonas* sp. AP-7.** Sang-Hyeob Lee, Hyun-II Choi and Won-Gi Bang\*. Department of Agricultural Chemistry, College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea - An ascorbic acid phosphorylating enzyme, which catalyzes the formation of ascorbic acid-2-phosphate from ascorbic acid and pyrophosphate, was purified 32.7-folds to homogeneity from a cell-free extract of *Cellulomonas* sp. AP-7. The combination of DEAE- Sphacel ion exchange chromatography and Sephacryl S-200 gel filtration was used for their purification. The molecular weight of the native protein was estimated to be 96.1kDa on high performance gel filtration chromatography. The SDS-PAGE analysis indicated that the protein consisted of four identical subunits of 24.6 kDa. The purified enzyme showed the optimal temperature of 40°C and optimal pH of 4.5. The Km for ascorbic acid and pyrophosphate were 119 mM and 11.9 mM, respectively. The addition of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) into the reaction mixture resulted in the reduction of the enzyme activity at 51%. The enzyme also had a phosphatase activity at weakly acidic pH and the Km for ascorbic acid-2-phosphate in phosphatase activity was 7.9 mM.

Ascorbic acid(AsA)는 의약품, 식품, 화장품 등의 분야에서 널리 사용되고 있으나, 수용액 상태에서 빠르게 산화되며, 산소, 열, 구리이온을 포함한 금속이온의 존재 등에 의해 쉽게 분해되는 단점이 있다(1-2). 이러한 결점을 극복할 수 있는 안정한 AsA 유도체의 생산에 대한 연구가 활발히 이뤄지고 있으며, 대표적인 유도체로 ascorbic acid-2-phosphate(AsA2P), ascorbic acid-2-sulfate 그리고 ascorbic acid- $\alpha$ -glucoside 등을 들 수 있다(4-7).

AsA2P는 열이나 산화적 분해에 대해 뚜렷한 안정성을 가지며, phosphatase에 의해 유리형 AsA로 해리되어 생체 내에서 비타민 C의 유효 활성으로 복원된다(8-11). 현재, AsA2P는 식품 및 사료첨가물로서 이용가치가 높으며(12-14), 화장품원료로서 실용화되고 있다(15).

미생물에 의한 AsA2P의 효소적 생산은 화학합성에 비해 특이성이 높으므로 많은 장점을 가질 것으로 기대되고 있고, 이에 대한 다수의 연구가 진행되고 있다(16-19). 본 연구에서는 인산공여체로 pyrophosphate를 이용하여 AsA를 AsA2P로 전환할 수 있는 균주 *Cellulomonas* sp. AP-7으로부터 AsA phosphorylating enzyme를 정제하고, 그 특성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 공시균주 및 시약

AsA phosphorylating enzyme(APE)의 생산을 위해 본 연구실에서 분리한 *Cellulomonas* sp. AP-7을 사용하였다.

효소정제에 사용한 DEAE-Sephacel과 Sephacryl S-200은 Pharmacia社의 제품이었으며, 기질인 AsA는 Showa Chemicals社, 인산공여체인 disodium pyrophosphate ( $\text{Na}_2\text{-PPi}$ )는 Sigma社, 그리고 AsA2P magnesium salt는 Wako Pure Chemical社로부터 구입하였다. 그밖의 일반시약류는 시판 1급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

#### 균주의 배양

공시균주 한 백금니를 1% polypeptone, 0.7% meat extract, 0.5% yeast extract, 0.3% NaCl 그리고 1% glycerol로 조성된 배지(pH 7.2) 5 ml를 함유하는 20 ml용 시험관에 접종한 후, 30°C에서 24시간 진탕배양하였다. 이 배양액 1 ml를 동일배지 50 ml를 함유하는 500 ml용 삼각플라스크에 접종한 후, APE 활성이 최대에 도달하는 시점(본 실험조건에서는 통상 16시간)에서 배양을 중단하였다. 배양액을 원심분리(10,000×g, 10분)하여 균체를 회수하고, 25mM Tris-HCl 완충액(pH7.5)로 세척하였다. 원심분리에 의해 균체를 회수하고, 생균체 1g에 대해 2 ml의 비율로 동일완충액을 첨가하여 현탁한

\*Corresponding author

Tel. 82-2-920-1330, Fax. 82-2-925-1970

E-mail: agrchem@kucny.korea.ac.kr

Key words: Ascorbic acid-2-phosphate, Ascorbic acid phosphorylating enzyme, Ascorbic acid

후, -80°C로 보관하면서 계속적인 실험에 사용하였다.

#### 효소활성측정 및 단백질정량

50 mM 초산나트륨 완충액, 200 mM AsA 그리고 200 mM Na<sub>2</sub>-PPi로 구성된 반응혼합액(pH4.5)에 효소제제를 첨가하여 30°C에서 3시간 반응시켰다. 생성된 AsA 2P는 HPLC(Waters model 510)로 정량하였다(19). 분리용 칼럼으로 Shodex C18-10B 칼럼(3.9×250 mm, Shoko Co., Ltd.)을 이용하여 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 용리액(pH3.0)을 1 ml/min의 유속으로 흘리면서 254 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 한편, AsA2P는 전개용매로 butanol-acetic acid-water(5:2:3, v/v)를 이용한 TLC(Silica gel 60F plate, Merck Co., Ltd.)로 정성적으로 확인하였다(19).

APE 활성의 1 unit는 30°C에서 1분동안에 1 μmole의 AsA2P를 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였으며, 비활성은 1 unit/mg protein으로 정의하였다.

칼럼용출분획의 단백질은 자외부 280 nm의 흡광도(Beckman Model DU-64 spectrometer)로, 기타 효소 용액은 bovine serum albumin을 표준단백질로 한 BCA 법(20)을 이용하여 정량하였다.

#### Phosphatase의 활성측정

반응혼합물은 서로 다른 50 mM 완충액, 효소제제 그리고 기질로서 5 mM *p*-nitrophenylphosphate (pNPP), 200 mM Na<sub>2</sub>-PPi 그리고 60 mM AsA2P로 조성하였다. 생성된 *p*-nitrophenol(pNP)은 400 nm의 흡광도를 측정하여, 동일조건에서 작성된 검량곡선으로부터 계산하였다. 한편, Na<sub>2</sub>-PPi의 분해산물인 유리 인산은 malachite green를 이용하여 측정하였으며(21), AsA는 HPLC로 측정하였다.

#### 효소정제

**무세포추출물의 조제** 냉동보존한 균체현탁액 15 ml를 해동시킨 다음, 30초 간격으로 7분간 초음파분쇄한 후, 원심분리(12,000×g, 30분)하여 상등액을 무세포추출물로 사용하였다.

**Ammonium sulfate 분획** 무세포추출물에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 처리하여 30~70% 분획을 회수하였다. 회수한 침전물을 15 ml의 20 mM 초산나트륨 완충액(pH 4.5)에 녹인 후, 원심분리(12,000×g, 10분)하여 얻은 상등액을 PD-10 칼럼(Bio-Rad Co.)을 이용하여 탈염하였다.

**이온교환크로마토그래피** 탈염한 효소액을 동일완충액으로 평형시킨 DEAE-Sephacel 칼럼(30×140 mm)에 흡착시킨 다음 동일완충액으로 세척하였다. 다음에 0~0.5 M NaCl과 20~100 mM Na-acetate(pH 4.5)로 농도구배를 걸어 21 ml/hr의 유속으로 용출하였다. 활성분획을 모아 Amicon YM30 membrane을 이용하여 농축

탈염하였다.

**겔여과크로마토그래피** 농축효소액을 0.1 M KCl를 함유하는 25 mM Tris·HCl 완충액(pH7.5)으로 평형시킨 Sephacryl S-200 칼럼(25×620 mm)을 이용하여 5 ml/hr의 유속으로 용출하였다.

#### 순도검정 및 분자량측정

정제효소의 순도를 검정하기 위하여 Laemmli(22)의 방법에 따라 12% 겔을 이용하여 SDS-PAGE에 걸었다. 효소의 분자량은 Shodex protein KW-803 칼럼(8×300 mm, Shoko Co., Ltd.)에 의한 HPGF 크로마토그래피를 통해 측정하였으며, 이 때 0.1 M KCl을 함유하는 25 mM Tris·HCl 완충액(pH 7.5)을 사용하여 0.7 ml/min의 유속으로 용출하였다. Subunit의 분자량은 Neville(23)의 방법에 따라 SDS-PAGE 상에서 측정하였다.

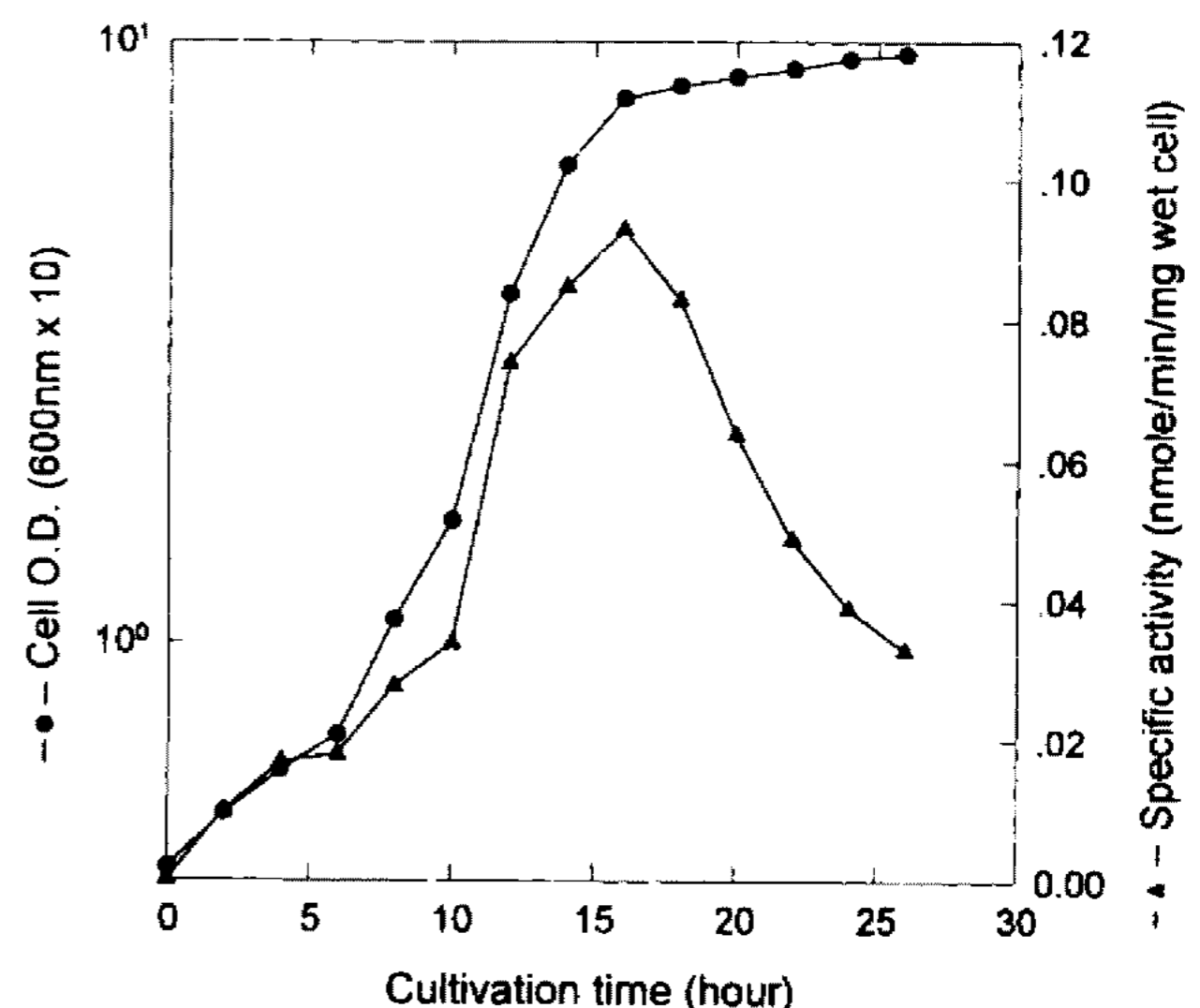
## 결과 및 고찰

#### 효소생산을 위한 최적배양

APE 활성이 최대인 균체를 수확하기 위해 배양시간의 경과에 따른 균체량과 효소활성의 변화를 비교·분석하였다. Fig. 1과 같이, 배양개시 후 16시간째에 최대활성에 도달하였으며, 이 때의 APE 비활성은 0.093 nmole/min/mg wet cell이었다. 따라서 효소활성이 최대인 16시간째에 균체를 수확하여 계속적인 실험에 사용하였다.

#### 효소정제 및 분자량

생균체 5 g에서 얻어진 무세포추출물을 Table 1의 과



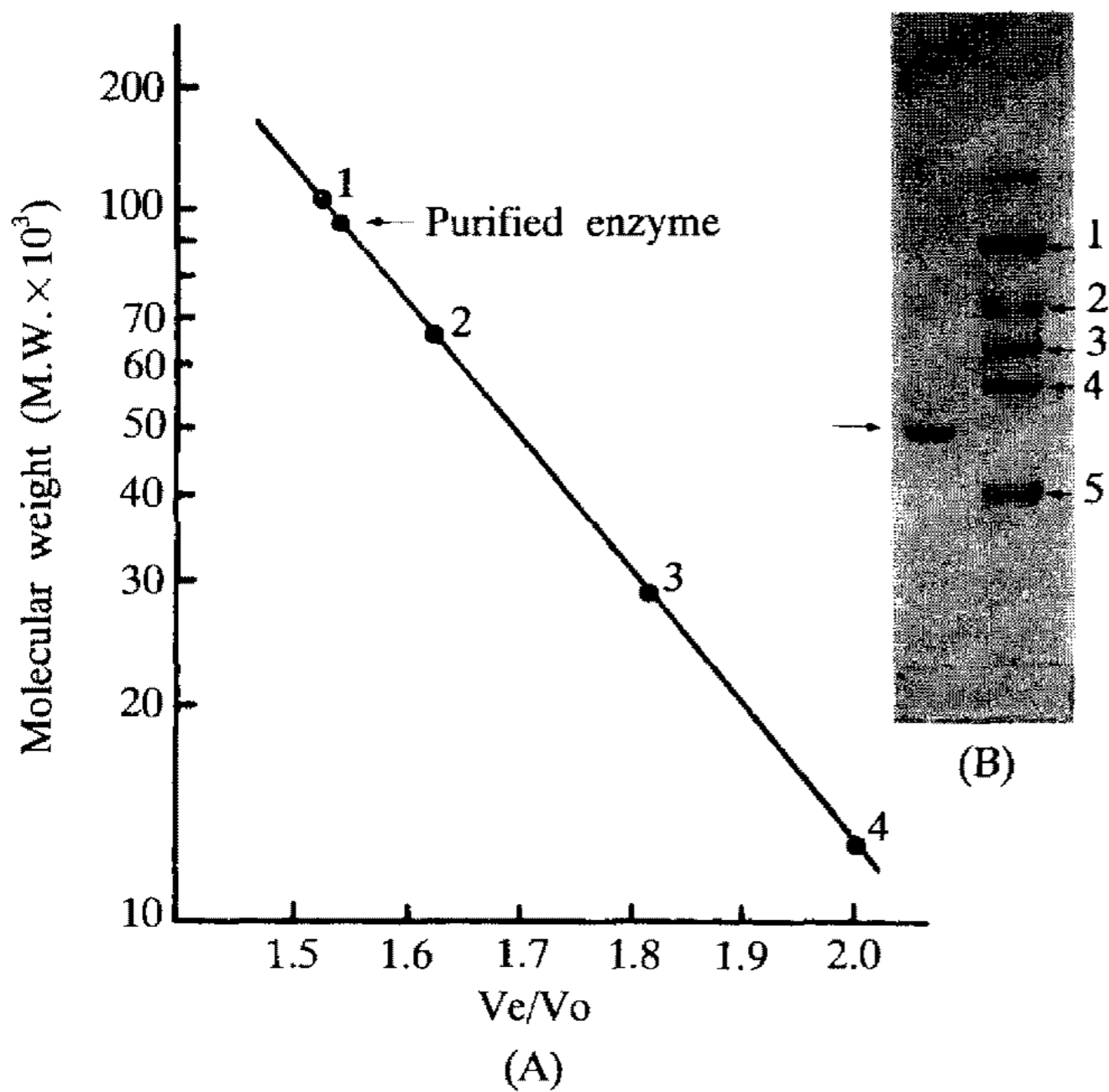
**Fig. 1. Growth curve of *Cellulomonas* sp. AP-7 and change in ascorbic acid phosphorylating activity.**

Cultivation was carried out at 30°C as described in Materials and Methods. Reaction was carried out for 16 hrs at 30°C in reaction mixture containing 50 mM AsA, 100 mM Na<sub>2</sub>-PPi and 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5).

**Table 1. Purification of ascorbic acid phosphorylating enzyme from *Cellulomonas* sp. AP-7**

Sample	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	325.39	0.916	0.0028	100	1
Ammonium sulfate	41.20	0.368	0.0089	40.2	3.2
DEAE-Sephacel	1.54	0.080	0.0501	8.7	17.9
1st Sephacryl S-200	0.57	0.040	0.0702	4.4	25.1
2nd Sephacryl S-200	0.33	0.033	1.1000	3.6	35.7

1U=1 μmole AsA2P per min.



**Fig. 2. Molecular weight measurement of the purified enzyme on high performance gel filtration chromatography (A) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (B).**

In (A), standard proteins were the following. 1. β-galactosidase (M<sub>r</sub> 116,000); 2. bovine serum albumin (M<sub>r</sub> 66,000); 3. carbonic anhydrase (M<sub>r</sub> 29,000); 4. cytochrome c (M<sub>r</sub> 12,400). In (B), lane a, ascorbic acid phosphorylating enzyme, b, molecular weight markers: 1. bovine serum albumin (M<sub>r</sub> 66,000); 2. egg albumin (M<sub>r</sub> 45,000); 3. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (M<sub>r</sub> 36,000); 4. carbonic anhydrase (M<sub>r</sub> 29,000); 5. trypsin inhibitor (M<sub>r</sub> 20,100).

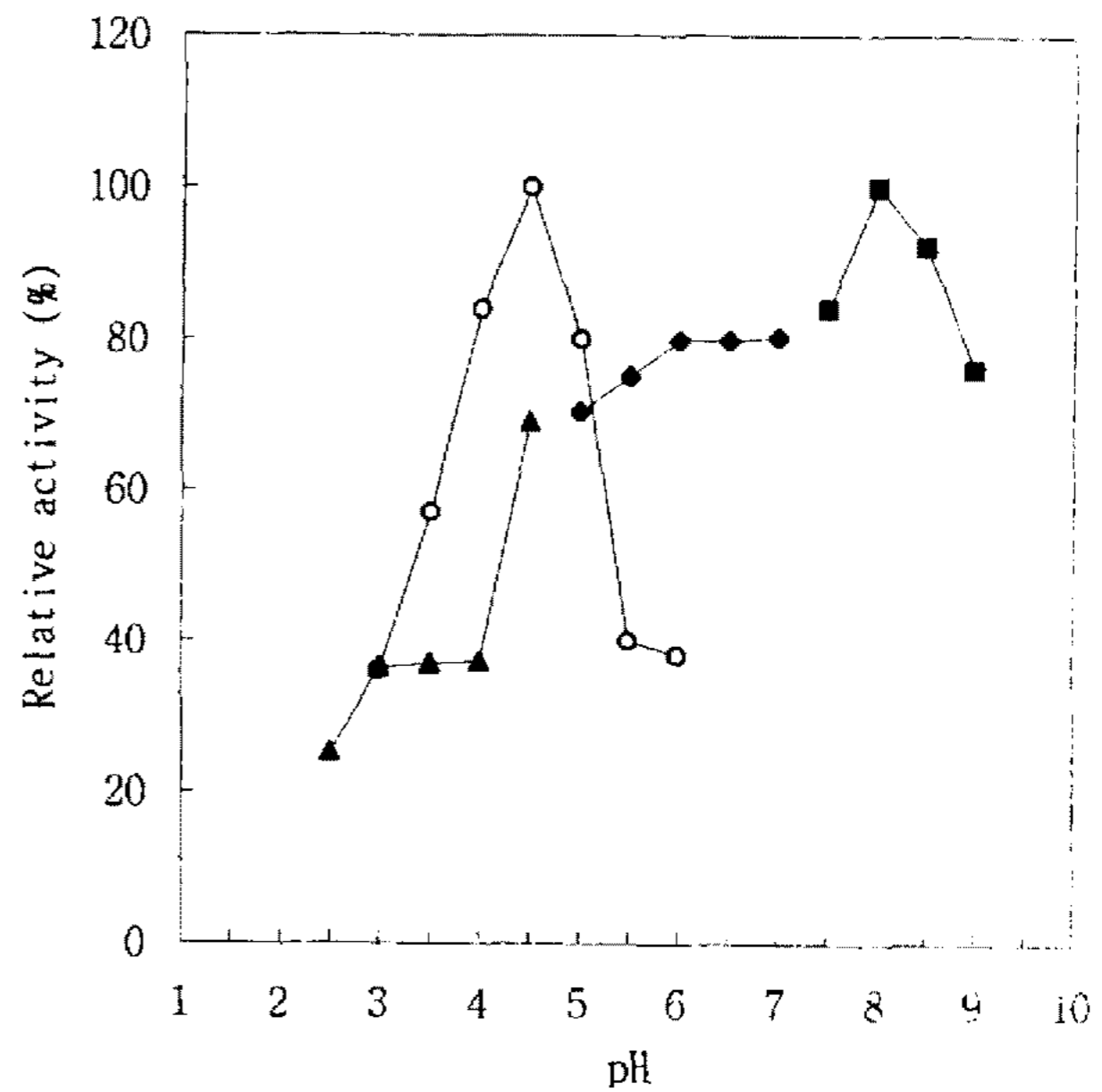
정에 따라 정제하였을 때, 32.7배 정제된 효소를 얻었으며, Fig. 2와 같이 SDS-PAGE 상에서 단일밴드를 나타내었다. 한편, 본 효소의 분자량은 SDS-PAGE 상에서는 24.6 kDa, Shodex KW-803 칼럼을 이용한 HPGF 크로마토그래피에서는 96.1 kDa으로 측정되었다(Fig. 2). 따라서 본 효소는 동일한 tetrameric subunit로 구성된 효소로 판단되었다.

**기질특이성**

AsA2P 생산에 미치는 인산공여체의 영향을 조사한 결과 Table 2에서와 같이, Na<sub>2</sub>-PPi가 인산공여체로서 가장 좋았으며, Lineweaver-Burk plot에서 구한 AsA와 PPi

**Table 2. Phosphoryl donor specificity of ascorbic acid phosphorylating enzyme**

Substrate	pH	Relative activity
ATP	5.5	51.7
ATP	4.5	41.2
p-Nitrophenylphosphate	4.5	23.4
Disodium pyrophosphate	4.5	100
Metaphosphate	4.5	22.7
Phosphoric acid	4.5	17.9



**Fig. 3. Effects of pH on activity and stability of the ascorbic acid phosphorylating enzyme.**

The activity was measured as described in materials and methods. The buffers used were sodium acetate (○), Tris-maleate (▲) and Tris-HCl buffer (■). The open circles showed the activity and the closed symbols showed the stability.

에 대한 Km 값은 각각 119 mM과 11.9 mM이었으며, V<sub>max</sub> 값은 각각 0.48 nmole/min과 3.79 nmole/min이었다(Fig. 5A, 5B).

**최적 pH 및 pH 안정성**

50 mM 초산나트륨 완충액을 사용하여 효소활성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과 Fig. 3과 같이, 본 효소는 pH4.5에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, pH 변화에 매우 민감한 경향을 보였다. 한편, pH2.5~9의 범위에서

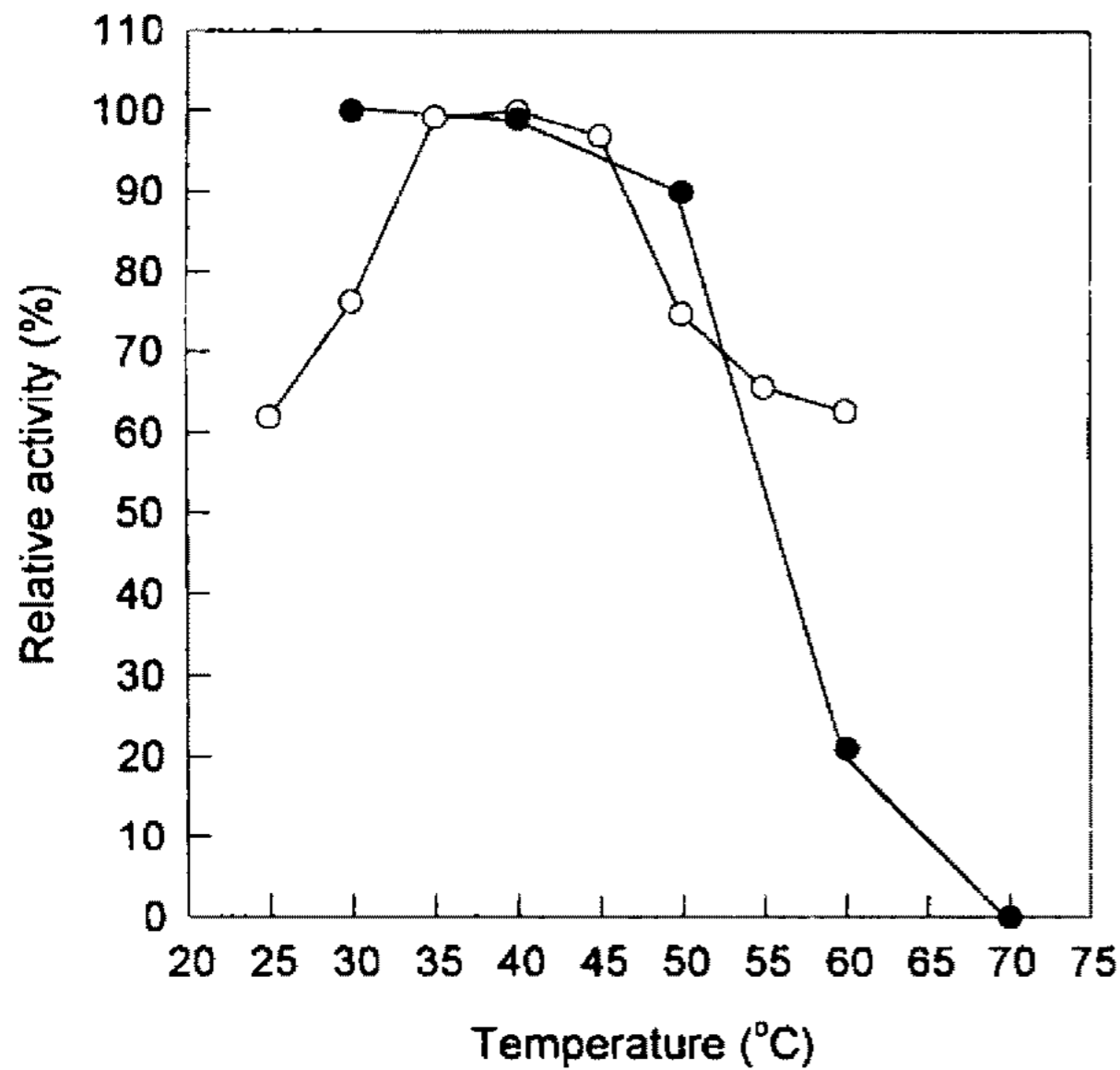


Fig. 4. Effects of temperature on activity and stability of the ascorbic acid phosphorylating enzyme.

The activity of the enzyme was measured as described in materials and methods. The open circle showed the activity and the closed circle showed the stability.

서로 다른 3종류의 완충액을 이용하여 6시간 처리하여 pH가 효소의 안정성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 본 효소는 알칼리영역에서 보다 안정하며(Fig. 3), 이는 APE 활성의 최적 pH가 4.5인 결과와는 상이하였다.

#### 최적 온도 및 열 안정성

본 효소의 최적온도는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 40°C 이었다. 한편, 정제효소를 30-80°C의 범위에서 1시간동안 처리하였을 때, 70°C에서 완전히 실활하였으나, 60°C에서는 약 21%의 잔존활성을, 50°C에서는 약 90%의 잔존활성을 보였다. 이 결과는 Koizumi 등(24)이 *P. azotocoligans* KT4661에서 분리한 APE 활성이 60°C에서 30분만에 완전히 실활되었다는 결과보다는 더 안정하였다.

#### 저해제

효소활성에 미치는 각종 금속이온 및 유기화합물의 영향을 조사하기 위해, 반응액에 Table 3과 같이 각종 금속이온과 유기화합물을 종류에 따라 1 mM, 5 mM 및 10 mM씩 첨가하여 활성에 미치는 영향을 비교·검토하였다. 그 결과, Fe<sup>2+</sup>와 EDTA에 의해 활성이 각각 43%, 46% 증가되며, Cu<sup>2+</sup>, NaN<sub>3</sub> 그리고 *p*-hydroxymercuribenzoate에 의해 다소 저해되었다. 그러나, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)에 의해 강하게 저해되어 51%의 실활이 관찰되었으며, 이는 본 효소의 활성에 -SH 그룹이 관여하고 있음을 강력히 시사하는 것으로 사료되었다. 이는 Koizumi 등(24)이 *P. azotocoligans* KT4661에서 분리한 APE 활성은 sulfhydryl reagent에 의해 저해

Table 3. Effect of various chemicals on the ascorbic acid phosphorylating enzyme activity

Compounds added	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	-	100
Ca <sup>2+</sup>	1.0	124
Mg <sup>2+</sup>	1.0	105
	10.0	113
Fe <sup>2+</sup>	1.0	143
Mn <sup>2+</sup>	1.0	100
Cu <sup>2+</sup>	1.0	99
	10.0	79
NaF	10.0	109
EDTA	1.0	146
NaN <sub>3</sub>	1.0	87
δ-Hydroxyquinoline	1.0	101
<i>p</i> -Hydroxymercuribenzoate	5.0	79
5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)	1.0	49
	5.0	49
Iodoacetate	1.0	91

The basal reaction mixture was incubated for 180 min at 30°C. The enzyme was incubated with a compound for 10min before the reaction was started with AsA and Na<sub>2</sub>-PPi.

Table 4. Effects of pH on phosphatase activity of ascorbic acid phosphorylating enzyme

pH	Relative activity (%)		
	PPi	p-NPP	AsA2P
3.5	66	4	45
4.0	82	7	80
4.5	100	21	100
5.0	30	41	20
5.5	21	60	19
6.0	12	66	10
6.5		72	
7.0		73	
7.5		100	
8.0		68	
8.5		58	
9.0		31	

The phosphatase activity was measured as described in Materials and Methods. The buffer used were sodium acetate buffer (3.0 to 5.5 of pH), Tris-maleate buffer (5.0 to 7.0) and Tri-HCl buffer (7.5 to 9.0).

되지 않았다는 결과와 상이한 결과이었다.

#### Phosphatase 활성

효소의 phosphatase 활성을 조사하기 위해, 기질로 pNPP, PPi 그리고 AsA2P를 기질로 이용하여 활성에 미치는 pH 효과를 조사하였다. Table 4에서와 같이 pNPP를 기질로 이용한 경우에는 pH7.5에서 phosphatase 활성이 가장 높았으며, PPi와 AsA2P에 대해서는 모두

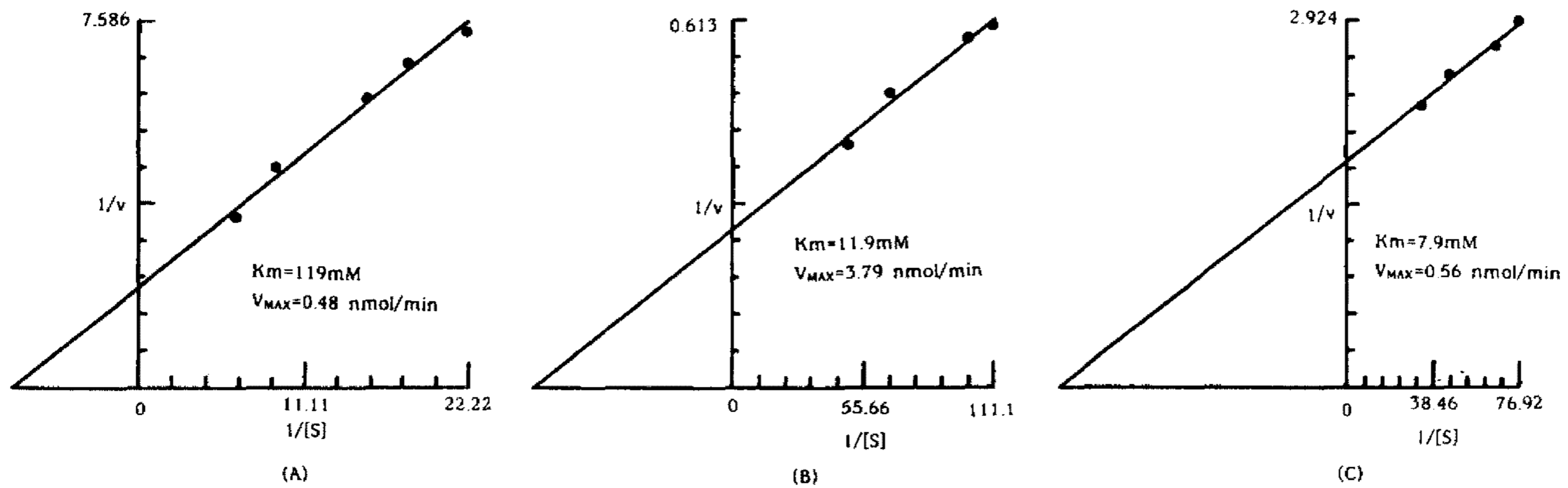


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for the formation of ascorbic acid-2-phosphate from ascorbic acid (A) and pyrophosphate (B), and for the hydrolysis of ascorbic acid-2-phosphate (C) by the purified ascorbic acid phosphorylating enzyme.

pH 4.5에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 한편, AsA2P에 대한  $K_m$  값은 7.9 mM이었다(Fig. 5C).

본 연구에서 정제된 APE는 인산공여체로 ATP 이외에 다양한 인화합물을 이용할 수 있었으며, 따라서 kinase의 일종이라기보다 phosphatase의 phosphotransferase 활성으로 사료되며, 실제로 Tani 등(25)은 *Escherichia freundii*로부터 정제·결정화한 acid phosphatase의 촉매작용에 의한 pyridoxine의 인산화를 보고하고 있으며, 또한 당류, 뉴클레오티드류 그리고 비타민류의 인산화도 역시 phosphatase 또는 phosphotransferase에 의해 촉매되는 것으로 보고되어 있다(26-29). 본 연구에서 정제된 APE의 phosphatase 활성을 검토한 결과, AsA2P에 대한  $K_m$  값은 7.9 mM이었으며, 이는 인산화반응에 있어서 AsA에 대한  $K_m$  값(119 mM) 보다는 훨씬 낮은 값이었다. APE에 의한 AsA 인산화의 최적 pH는  $\text{PPi}$ 를 이용한 경우에 4.5, ATP를 이용한 경우에는 5.0이었다. *E. freundii*와 *P. mirabilis*의 phosphatase는 유사한 산성 pH 영역에서 인산화 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다(25, 28). 한편, Koizumi 등(24)은 *P. azotocolligans*로부터 정제된 APE는 분자량 30 kDa의 단량체로 보고하였으나, 본 실험의 결과와는 상이하였다.

이상의 결과를 조합해 볼 때, APE에 의한 AsA와  $\text{PPi}$ 로부터 AsA2P로의 전환은 phosphatase 활성의 역반응에 의해 이뤄지는 것으로 사료되며, 이는 본 균주의 무세포추출물을 이용한 AsA2P 생산의 최적조건에서 반응액에 첨가되는 AsA의 절반이상이 인산화되지 않는 사실로부터 알 수 있다(19). AsA로부터 AsA2P를 보다 효율적으로 생산하기 위한 APE 유전자의 클로닝 연구가 앞으로 기대되고 있다.

## 요 약

Ascorbic acid와 pyrophosphate로부터 ascorbic acid-

2-phosphate의 생성을 촉매하는 ascorbic acid phosphorylating enzyme를 DEAE-Sepharose 이온교환크로마토그래피와 Sephacryl S-200 겔여과크로마토그래피를 이용하여 *Cellulomonas* sp. AP-7의 무세포추출물로부터 32.7-folds로 정제하였다. 정제된 효소의 분자량은 high performance gel chromatography 상에서 96.1 kDa으로 측정되었다. SDS-PAGE 분석에 의해, 본 효소는 24.6 kDa의 동일한 4개의 subunit로 구성되어 있는 것으로 추정하였다. 정제효소의 최적온도와 최적 pH는 각각 40°C와 4.5이었다. Ascorbic acid-2-phosphate 생성반응에 있어서, ascorbic acid와 pyrophosphate에 대한  $K_m$  값은 각각 119 mM과 11.9 mM이었다. 본 효소는 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)에 의해 활성이 51% 감소하였다. 한편, 본 효소는 phosphatase 활성도 나타내었으며, ascorbic acid-2-phosphate에 대한  $K_m$  값은 7.9 mM이었다.

## 감사의 말

본 연구는 1995년도 과학기술처 선도기술과제(BNS 81480-754-2)의 위탁연구로 수행되었으며, 연구비지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Friedrich, W. 1988. Vitamins, Water De Gruyter & Co., Berlin.
2. Takamura, K. and M. Ito. 1977. Effects of metal ions and flavonoids on the oxidation of ascorbic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **25**: 3218-3225.
3. Nomura, H., T. Ishiguro, and S. Morimoto. 1969. Studies on L-ascorbic acid derivatives. II. L-ascorbic acid 3-phosphate and 3-pyrophosphate. *Chem. Pharm. Bull.* **17**: 381-386.
4. Nomura, H. and K. Sugimoto. 1966. Synthesis of L-as-

- corbic acid acyl derivatives stabilized against oxidation. *Chem. Pharm. Bull.* **14**: 1039-1044.
5. Nomura, H. and M. Shimomura, and S. Morimoto. 1971. Studies on L-ascorbic acid derivatives. VI. phosphorylation of L-ascorbic acid and its isopropylidene derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **19**: 1433-1437.
  6. Seib, P. A., Y. T. Liang, C. H. Lee, R. C. Hosney, and C. W. Deyo. 1974. Synthesis and stability of L-ascorbate 2-sulfate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 1220-1224.
  7. Muto, N., S. Suga, K. Fujii, K. Goto, and I. Yamamoto. 1990. Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice sees  $\alpha$ -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1697-1703.
  8. Machlin, L. J., F. Garcia, W. Kuenzig, and M. Brin. 1979. Antiscobutic activity of ascorbic acid phosphate in the rhesus monkey and the Guinea pig. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**: 325-333.
  9. Imai, Y., Y. Usui, T. Matsuzaki, H. Yokotani, H. Mima, and Y. Aramaki. 1967. The Antiscobutic activity of L-ascorbic acid phosphate given orally and percutaneously in Guinea Pigs. *Jap. J. Pharmacol.* **17**: 317-324.
  10. Mima, H., H. Nomura, Y. Imai, and H. Takashima. 1970. Chemistry and application of ascorbic acid phosphate. *Vatamins(Japan)* **41**: 387-398.
  11. Wang, X. Y., M. L. Liao, T. H. Hung, and P. A. Seib. 1988. Liquid chromatographic determination of L-ascorbate 2-phosphate in fish feeds by enzymatic release of L-ascorbate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**: 1158-1161.
  12. El Naggar, G. O. and R. T. Lovell. 1991. L-Ascorbyl 2-monophosphate has Equal antiscobutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish. *J. Nutr.* **121**: 1622-1626.
  13. Sapers, G. M., K. B. Hicks, J. G. Phillips, L. Garzarella, D. L. Pondish, R. M. Matulaitis, T. J. McCormack, S. M. Sondey, P. A. Seib, and Y. S. El-Atawy. 1989. Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors, and complexing agents. *J. Food Sci.* **54**: 997-1002.
  14. Sapers, G. M., R. L. Miller, F. W. Douglas, and K. B. Hicks. 1991. Uptake and fate of acorbic acid-2-phosphate in infiltrated fruit and vegetable tissue. *J. Food Sci.* **56**: 419-422.
  15. Takashim, H., H. Nomura, Y. Imai, and H. Mima. 1971. Ascorbic acid esters and skin pigmentation. *Am. Perf. Cosmet.* **86**: 29-36.
  16. Fujio, T., A. Maruyama, and S. Koizumi. 1989. Enzymic preparation of ascorbic acid-2-phosphate. *Eur. Pat. Appl.* EP319130.
  17. Maruyama, A., S. Koizumi, and T. Fujio. 1990. Enzymatic production of ascorbic acid-2-phosphate. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2309-2313.
  18. 弓場善雄 · 田村圭史郎 · 橋本幸生 · 藤尾達郎. 1990. 酵素を固定化した樹脂組成物および該樹脂組成物を用いるアスコルビン酸-2-リン酸の製造法. 日本公開特許公報. 平2-283283.
  19. 최현일, 이상협, 방원기. 1996. Ascorbic acid와 pyrophosphate로부터 ascorbic acid-2-phosphate의 효소적 생산. *한국산업미생물학회지.* **24**: 613-618
  20. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
  21. Baykov, A. A., O. A. Evtushenko, and S. M. Avaeva. 1988. A Malachite green procedure for orthophosphate determination and Its Use in alkaline phophatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* **171**: 266-270.
  22. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the asembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**: 680-685.
  23. Nevile, D. M. 1971. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.* **246**: 6328-6334.
  24. Koizumi, S., A. Maruyama, and T. Fujio. 1990. Purification and charaterization of ascorbic acid phosphorylating enzyme from *Pseudomonas azotocolligans*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 3235- 3239.
  25. Tani, Y., Tochikura T, Yamada H., and K. Ogata 1967. Crystalline acid phosphatase having pyridoxine-phosphating activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**: 769-772.
  26. Morton, R. L. 1958. The phosphotransferase activity of phosphotase. *Biochem. J.* **70**: 134- 139.
  27. Ogata, K., Y. Tani, and S. Yamamot 1964. Microbial phosphorylation of pyridoxine. *Agric. Biol. Chem.* **29**: 809-810
  28. Kuwahara, M., Tachiki, T., and T. Tochikura 1972. Distribution and properties of NAD phosphorylating reaction. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 745-752.
  29. Kuwahara, M., Tachiki, T., Tochikura T., and K. Ogata. 1972. Distribution and properties of NAD phosphorylating reaction. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 745-754.

(Received 27 January 1997)