KOR. JOUR. MICROBIOL. March, 1988 p. 52-59 Vol. 26, No. 1

*Saccharomyces cerevisiae*에서 분리한 L-Galactono-1, 4-lactone Oxidase의 특성

이승복·강사욱
서울대학교 자연과학대학 미생물학과

Characterization of L-Galactono-1,4-lactone Oxidase Purified from *Saccharomyces cerevisiae*

Lee, Seungbok and Sa-Ouk Kang
Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University

ABSTRACT: A partially purified preparation of L-galactonolactone oxidase which catalyzes the last step of L-ascorbic acid biosynthesis was obtained from *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26787. The purification procedures included Triton X-100 treatment, protamine sulfate precipitation, ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography, Sephadex G-150 gel filtration chromatography, and Phenyl-Sepharose CL-4B hydrophobic interaction chromatography. The optimum temperature for the enzyme activity was about 34°C and the optimum pH was 6.8-7.0. The substrate specificity was confined to L-aldonolactones, L-galactono-1,4-lactone and L-gulono-1,4-lactone. An apparent Km value of 0.294 mM with L-galactono-1,4-lactone as a substrate was found. By comparing the substrate specificities of this enzyme with those of isofunctional enzymes of higher plants and animals, it becomes evident that the enzyme of *S. cerevisiae* ATCC 26787 is rather similar to the L-gulonolactone oxidase of animals than the galactonolactone dehydrogenase of higher plants.
KEY WORDS □ ***Saccharomyces cerevisiae*, L-galactono-1,4-lactone oxidase.**

L-Ascorbic acid는 사람, 원숭이, guinea pig 등을 제외한 동물과 식물에서 육탄당 대사의 산물로 생합성된다. 이들 고등생물은 서로 상이한 생합성 경로를 통하여 L-ascorbic acid를 형성하나, 방사성 동위원소로 포지된 당을 추적물(tracer)로 사용한 연구결과에 의하면 공통적으로 D-glucose가 궁극적인 전구물질로 사용되며 대사과정중 여섯개의 탄소가 보존된다는 사실이 밝혀졌다(Helsper 등, 1982).

쥐와 같이 L-ascorbic acid를 생합성하는 동물에 있어서는 다음의 경로를 통하여 생합성대사가 이루어진다(Helsper 등, 1982).

D-Glucose→D-glucuronate→L-gulonate→L-gulono-1, 4-lactone→L-ascorbic acid

위의 생합성 경로에서 마지막 단계는 L-gulonolactone oxidase(L-gulono-γ-lactone : oxygen 2-oxidoreductase, EC 1.1.3.8)에 의해 촉매된다(Kenney 등, 1976 ; Nishikimi 등, 1977).

식물의 경우에 있어서는 D-glucose로부터 ascorbic acid로 전환되는 사실과 D-gulonate가 중간산물로 생성되지 않는다는 점은 명확히 증명되었으나(Loewus 등, 1971), 구체적인 대사과정은 아직 밝혀지지 않고 있다. Strawberry, pea seed, cauliflower floret 등의 식물에서는 ascorbic acid의 최종전구체로 L-galactono-1, 4-lactone이 관여하는 대사경로가 제안되고, 이 반응에 관여하는 효소인 L-galactonolactone dehydrogenase (L-galactono-γ-lactone : ferricytochrome C

oxidoreductase, EC 1.3.2.3)가 분리된 바 있다. 이 효소는 전자전달 수용체로서 cytochrome C를 요구한다(Mapson 등, 1958; Baig 등, 1970; Loewus, 1971).

좀 더 하등한 생물체의 경우에 있어서는 L-ascorbic acid의 합성에 대하여 거의 알려진 바가 없으나, 몇몇 종류의 조류와 균류에서 L-ascorbic acid나 D-araboascorbic acid (D-erythorbic acid, isovitamin C)가 생성된다고 보고된 바 있다. *Chlorella pyrenoidosa* (Renstrøm 등, 1982/1983) 등의 조류는 식물과 유사한 반면, *Poteriochromonas danica* (Helsper 등, 1982), *Euglena gracilis* (Shigeoka 등, 1979), *Cyclotella cryptica* (Grün 등, 1984) 등의 조류는 동물과 유사하게 D-glucose를 L-ascorbic acid로 전환시킨다.

*Penicillium*에서는 1960년대 Takahashi 등에 의해 D-erythorbic acid가 몇몇 *Penicillium*의 배양산물에서 얻어진 이래 여러 연구가 진행되어 다음의 생합성경로가 제시되었다(Takahashi 등, 1976).

D-Glucose→D-glucono-δ-lactone→ D-glucono-γ-lactone→D-erythorbic acid

위의 생합성 경로에서 마지막 단계를 촉매하는 D-gluconolactone dehydrogenase가 *Penicillium cyaneofulvum*에서 분리되었는데, 동·식물체에서 각각 발견되는 L-gulonolactone oxidase, L-galactonolactone dehydrogenase와 유사한 성질을 갖는 것으로 알려져 있다(Takahashi 등, 1976).

한편 yeast에 있어서는 L-galactono-1,4-lactone을 L-ascorbic acid로 전환시키는 L-galactonolactone oxidase가 존재함이 Bleeg (1966)에 의해 밝혀진 이후에, 많은 종류의 yeast에서 L-ascorbic acid의 존재가 보고되었다(Heick 등, 1972). Baker's yeast에서는 2가지 종류의 L-galactonolactone oxidase가 발견되었다. Bleeg 등(1982)에 의해 분리된 효소는 식물의 galactonolactone dehydrogenase와 유사하며, Nishikimi 등(1978)에 의해 분리된 경우는 동물에서 발견된 L-gulonolactone oxidase와 유사한 성질을 갖는다(Kenney 등, 1976; Nishikimi 등, 1977). 같은 기능을 갖는 이들 두 효소는 기질특이성, 유사기질(substrate analog)에 의한 저해, 분자량, cofactor composition 등에서 매우 다르다(Leung 등, 1985).

한편 ascorbic acid는 생체내의 중요한 환원제로서 여러 생리적 기능을 갖고 있으며 특히 세포분열의 기작이 파괴되는 괴혈병과 암의 예방 및 치료에 효과가 있다고 알려져 있어, ascorbic acid의 생물학적 분해와 그 산물의 생리적 기능을 밝히는 연구가 최근에 진행되어 왔다(Cameron 등, 1979).

본 연구에서는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26787로부터 L-galactonolactone oxidase를 부분정제하여 그 특성을 살펴봄으로서, 이 균주를 이용하여 L-ascorbic acid의 생물학적 기능을 밝히려는 연구에 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

본 실험에 사용된 시약은 다음의 곳에서 구입하였다. L-Galactono-1,4-lactone, L-gulono-1,4-lactone, D-galactono-1,4-lactone, D-glucurono-1,4-lactone은 ICN Biomedicals로부터 구입하였다. D-Gulono-1,4-lactone, D-glucono-1,5-lactone, Triton X-100, sodium deoxycholate, α,α'-dipyridyl, trichloroacetic acid는 Sigma Chemical의 제품을, Sephadex G-150, DEAE-Sepharose CL-6B, Phenyl-Sepharose CL-4B는 Pharmacia의 제품을 사용하였다. o-Phosphoric acid는 Shinyo Pure Chemical로부터 ferric chloride(hexahydrated form)는 Hayashi Pure Chemical로부터 구입하였다.

2. 균주 및 배양조건

Saccharomyces cerevisiae ATCC 26787을 12l의 액체완전배지에 5×10 cells ml^{-1}의 농도로 접종한 후, 18l 용량의 배양조에 넣어 30℃에서 24시간 진탕배양하였다. 액체완전배지의 조성은 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose 였다.

3. 효소 활성도 측정

L-Galactonolactone oxidase의 활성도는 Zannoni 등(1974)이 제시한 방법과 UV spectro-

photometer에 의한 방법을 선택적으로 사용하여 측정하였다. 효소의 활성단위는 1분당 1 μmol의 L-ascorbic acid를 생성시킬 수 있는 양을 1 unit로 정의하였다.

1) Zannoni 등의 방법에 의한 활성도 측정

L-Galactono-1. 4-lactone (3 mM)을 포함하는 1.1 ml의 0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 5.6)와 효소용액 0.2 ml을 34℃에서 15분간 반응시킨후, 50% trichloroacetic acid 수용액 0.2 ml과 98% o-phosphoric acid 0.2 ml을 넣어 반응을 중단시키고 침전된 단백질은 원심분리하여 제거하였다. 상층액에 존재하는 L-ascorbic acid의 정량을 위하여 상층액 1 ml을 1% α,α'-dipyridyl 수용액 1 ml과 섞은후 0.12 ml의 3% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 수용액을 첨가하여 35℃에서 15분간 반응시켰다. 이 반응에서 형성된 ferrous ion과 α,α'-dipyridyl complex의 양을 525 nm에서 측정하였다.

2) UV spectrophotometer에 의한 활성도 측정

L-Ascorbic acid는 265 nm에서 최대 흡광도를 갖고 있으므로 (Hewitt 등, 1961), Gilford 250 spectrophotometer를 이용하여 초기 10분간의 반응에 의한 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소용액을 포함하는 0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 5.6) 1.9 ml에 60 mM L-galactonolactone 수용액을 0.1 ml 첨가시켜 34℃에서 반응을 시작시켰다.

4. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준시료로 하여 Lowry 등(1951)의 방법과 Bradford (1976)의 방법을 병용하였다.

5. L-Galatonolactone oxidase의 부분정제

L-Galatonolactone oxidase의 부분 정제과정은 다음과 같으며 모든 조작은 4℃에서 행하였다.

1) 조효소 (Crude extract)

S. cerevisiae 200g (wet weight)을 동량 부피의 buffer A (0.1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.6), aluminum oxide와 혼합한 후, Omni mixer (Du Pont Instrument No. 17047)로 1시간동안 파괴시켜 8,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 조효소로 사용하였다.

2) Triton X-100 처리

위에서 얻은 조효소에 Triton X-100을 마지막 농도가 2%되게 첨가한 후, magnetic stirrer를 이용하여 24시간 동안 저어주었다.

3) Protamine sulfate 분획

위에서 얻어진 효소액에 protamine sulfate를 0.25% (w/v)되게 첨가하면서 magnetic stirrer를 이용하여 1시간동안 저어주었다. 생성된 침전물은 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 제거하였다.

4) Ammonium sulfate 분획

위에서 얻어진 상층액에 ammonium sulfate를 사용하여 43%까지 서서히 포화시켜 1시간동안 저어준 후, 생성된 침전물을 12,000×g에서 1시간동안 원심분리하여 소량의 buffer B (1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 8.6)에 녹였다. 이 효소시료를 투석막에 넣고 buffer A에 대해 24시간 투석시켜 얻은 효소용액을 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 투석시 생성된 침전물을 제거한 후 ammonium sulfate 분획물로 사용하였다.

5) DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography

위에서 얻어진 0-43% ammonium sulfate 분획물을 buffer C (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, 0.01% NaN_3, pH 8.2)로 평형시킨 DEAE-Sepharose CL-6B column (2.7×13.6 cm)에 얹고 동일 buffer 60 ml로 세척하였다. 단백질은 1.5 M NaCl을 포함한 buffer C로 용출시켰다. 이 때의 용출속도는 10 m$l$hr^{-1}이었고, 3 ml씩 분획하였다.

6) Sephadex G-150 gel filtration chromatography

DEAE-Sepharose CL-6B chromatography의 분획물중 효소활성이 있는 분획을 모아 Diaflo PM10 membrane으로 ultrafiltration하여 농축한 후, buffer D (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, 0.01% NaN_3, pH 8.6)로 평형시킨 Sephadex G-100 column (3.1×105 cm)에 얹고 동일한 buffer로 용출시켰다. 이때의 용출속도는 15 m$l$hr^{-1}이었고, 6 ml씩 분획하였다.

7) Phenyl-Sepharose CL-4B hydrophobic chromatography

Sephadex G-150 chromatography에서 효소활

성이 있는 분획을 모아 buffer E(0.2M potassium phosphate, 1mM EDTA, pH7.2)로 평형시킨 Phenyl-Sepharose CL-4B column(1.5×12 cm)에 얹고 동일 buffer 20ml로 세척하였다. 단백질은 buffer F(10mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, 0.25% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, pH7.2)로 용출시켰다. 이때의 용출속도는 5ml hr^{-1}이었고, 3ml씩 분획하였다.

6. 효소의 활성도에 대한 온도와 pH의 영향

효소의 활성도에 대한 온도의 영향을 조사하기 위해 20℃에서 50℃ 사이의 온도에서 효소 활성을 측정하였다. 효소 반응의 활성에너지(Ea)는 Arrehnius 방정식으로 구하였다.

효소 활성도에 대한 pH의 영향은 반응 혼합물 속에 존재하는 0.1M phosphate-citrate buffer (pH5.6) 대신에, 0.1M phosphate-citrate buffer(pH4.0-7.0), 0.1M potassium-phosphate buffer(pH6.0-8.0), 0.1M Tris-HCl buffer(pH8.0-9.6)를 이용하여 효소활성을 측정하였다.

7. 기질 특이성

효소의 기질 특이성을 조사하기 위하여 2mM 농도의 L-galactono-γ-lactone, L-gulono-γ-lactone, D-galactono-γ-lactone, D-gulono-γ-lactone, D-glucono-γ-lactone, D-glucurono-δ-lactone을 기질로 주어 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. L-Galactonolactone oxidase의 부분정제

1) DEAE-Sepharose ion exchange chromatography

조효소(crude extract)에 Triton X-100을 2% 되게 처리한 후 protamine sulfate를 0.25%(w/v)되게 첨가하여 생성된 침전물을 원심분리 하였을 때, L-galactonolactone oxidase는 대부분 상층액에 존재하였다. Yeast로부터 L-galactonolactone oxidase를 분리할 때, 이 효소를 녹여내는 detergent로서 Triton X-100을 사용함은 Bleeg 등(1982)에 의해 보고된 바 있다. 위의 상층액을 ammonium sulfate 포화도 0-43%의 범위에서 분획하였을 때 조효소 보다 4.75배 높은 활성을 나타내었다(Table 1). 위와 같은 specific activity의 증가량은 baker's yeast의 미토콘드리아 부분만을 파괴시켜 조효소로 사용한 경우와 비슷하다(Nishikimi 등, 1978 ; Bleeg 등, 1982).

Ammonium sulfate 0-43% 포화도에서 분획한 효소용액을 DEAE-Sepharose CL-6B column에 얹은 후 buffer C로 세척하였을 때, 효소 활성을 보이지 않는 많은 단백질들이 제거되었다(Fig. 1). L-Galactonolactone oxidase는 NaCl 0.7M 근방에서 용출되는 것으로 보아 DEAE-Sepharose resin에 비교적 강하게 결합한다.

Table 1. *Purification of L-galactono-1,4-lactone oxidase. Starting material was 200 g of yeast (wet weight).*

Purification step	Combined volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (mU)	Specific activity (mU/mg)	Purification factor (n-factor)	Recovery (%)
Crude extract	290	2,242	4,200	1.87	1.00	100.00
Treatment of Triton X-100	325	2,001	4,333	2.16	1.15	103.17
Precipitation by $(NH_4)_2SO_4$	87	483	2,291	4.74	2.53	54.50
DEAE-Sepharose chromatography	90	118	1,650	13.90	7.43	39.30
Sephadex G-150 chromatography	70	25	1,458	58.32	31.18	34.70
Phenyl-Sepharose chromatography	5.8	8.05	847	105.20	56.25	20.00

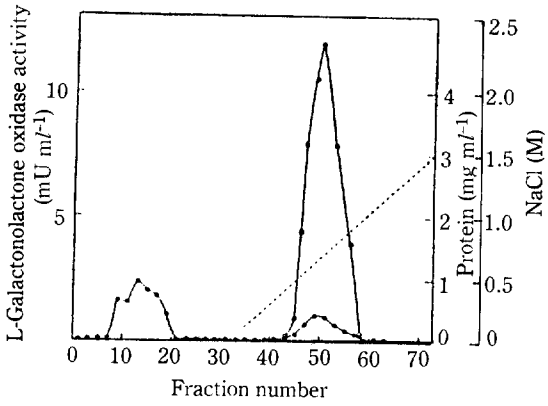

Fig. 1. *Ion exchange chromatography of L-galactonolactone oxidase on DEAE-Sepharose CL-6B.*
The column was eluted with gradient of 0-1.5 M NaCl in 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, 0.01% NaN_3 (pH 8.2). The open circles refer to L-galactonolactone oxidase activity. The closed circles represent protein concentration. The volume of each fraction was 3 m*l* and collected at flow rate of 7 m*l* per hour.

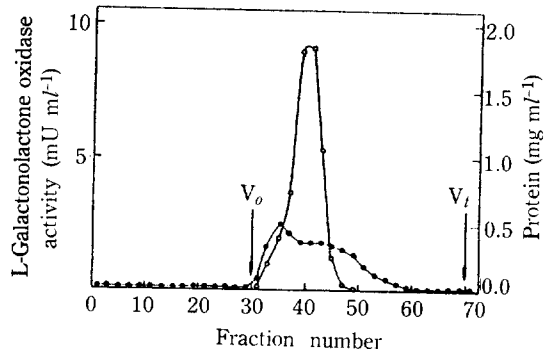

Fig. 2. *Gel filtration chromatography of L-galactonolactone oxidase on Sephadex G-150.*
The column was eluted with 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, 0.01% NaN_3 (pH 8.6). The open circles refer to L-galactonolactone oxidase activity. The closed circles represent protein concentration. The volume of each fraction was 6 m*l* and collected at flow rate of 15 m*l* per hour.

2) Sephadex G-150 gel filtration chromatography

DEAE-Sepharose CL-6B chromatography에서 효소활성을 높게 보이는 fraction(47-57)을 모아서 Diaflo PM10 membrane으로 농축시킨 후, Sephadex G-150 column에 얹어 전개하였을 때 효소의 활성은 하나의 peak로 나타났으며, ion exchange chromatography에서와 같이 단백질 peak와 중복되었다(Fig. 2). 이 과정을 통하여 수율은 39.7%에서 34.7%로 약간 감소한 반면 specific activity는 약 4배의 증가를 보였다 (Table 1).

3) Phenyl-Sepharose CL-4B hydrophobic interaction chromatography

L-Galactonolactone oxidase와 Phenyl-Sepharose간의 hydrophobic interaction은 potassium phosphate에 의한 ionic strength를 감소시키고

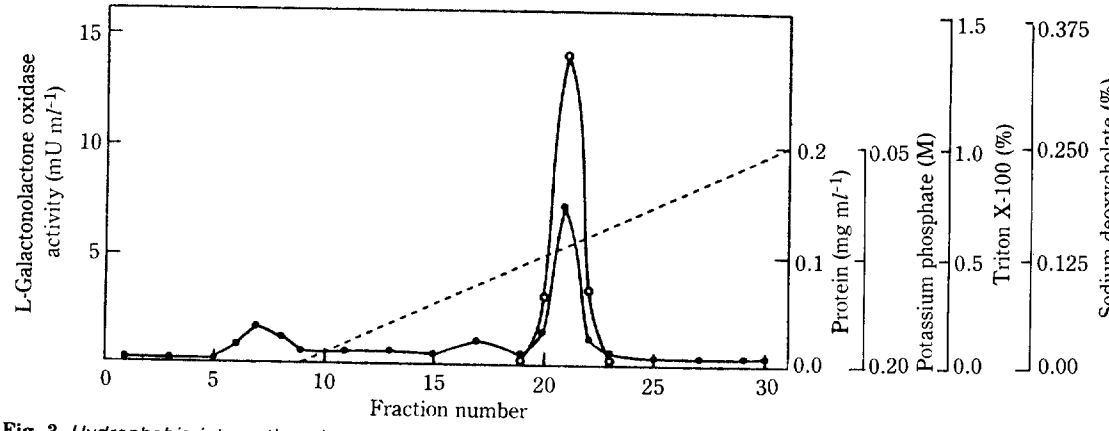

Fig. 3. *Hydrophobic interaction chromatography of L-galactonolactone oxidase on Phenyl-Sepharose CL-4B.*
The column was eluted with detergent gradient. The starting buffer was 0.2 M potassium phosphate, 1 mM EDTA (pH 7.2). The final buffer was 10 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, 0.25% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100 (pH 7.2). The open circles refer to L-galactonolactone oxidase activity. The closed circles represent protein concentration. The volume of each fraction was 3 m*l* and collected at flow rate of 5 m*l* per hour.

detergent (Triton X-100, sodium deoxycholate)의 농도를 증가시켜 파괴함으로써 이 효소를 용출시켰다(Fig. 3). Fraction 20-23에서 단백질과 효소활성도의 peak가 일치되는 것으로 보아 이 효소의 순수도가 높음을 알 수 있었다. 위 부분을 모아 potassium phosphate와 detergent를 제거한 후 농축하였을때 엷은 노란색을 나타내었는데, 이는 baker's yeast로부터 분리한 L-galactonolactone oxidase가 flavin을 갖고 있다는 보고(Kenney 등, 1979)와 부합된다.

위와 같은 여섯단계의 분리과정을 통하여 효소용액은 조효소에 비해 약 56배 높은 활성을 나타내었으며 수율은 20%였다(Table 1). 이 효소용액을 L-galactonolactone oxidase의 특성분석을 위한 효소원으로 사용하였다.

2. 효소 활성도에 대한 온도의 영향

반응 혼합물을 온도조건만 변화시키고 효소의 활성을 측정한 결과 34℃가 최적 반응온도임을 알 수 있었다. 34℃를 중심으로 온도가 변화함에 따라 효소 활성은 대칭적으로 감소하였다(Fig. 4). 각 온도 구간의 활성에너지(Ea)는 20-25℃에서 13.4 kcal mol^{-1}, 25-30℃에서 8.56 kcal mol^{-1}, 30-34℃에서 4.251 kcal mol^{-1}로서 최적 반응온도에 접근할수록 반응에 필요한 Ea는 감소하였다. 이와 같은 최적 반응온도는 Nishikimi 등(1978)에 의해 baker's yeast로부터 분리된 L-galactonolactone oxidase의 경우와 유사하다.

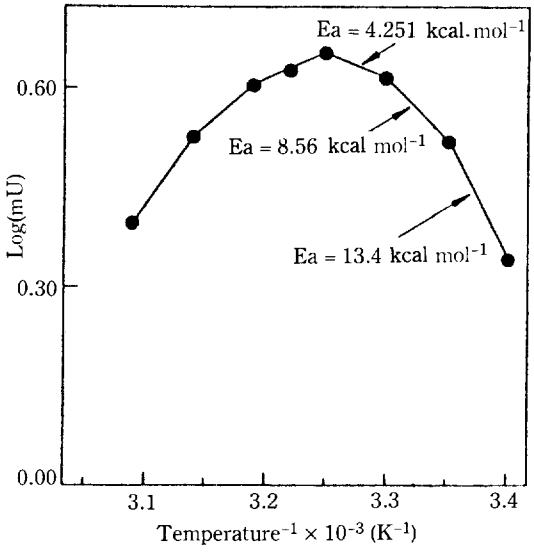

Fig. 4. *Effect of temperature on the activity of L-galactonolactone oxidase.*
Reactions were carried out for 15 min in 0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 5.6) containing 3 mM L-galactono-1,4-lactone.

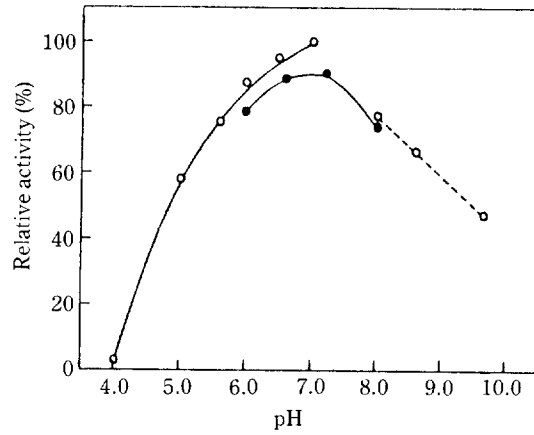

Fig. 5. *Effect of pH on the activity of L-galactonolactone oxidase.*
Reactions were carried out for 15 min at 34°C in various buffers containing 33 mM L-galactono-1,4-lactone. The 0.1 M phosphate-citrate for pH 4.0 to 7.0 (○—○), 0.1 M potassium-phosphate for pH 6.0 to 8.0 (●—●), and 0.1 M Tris-HCl for pH 8.0 to 9.6 (○----○) were used.

3. 효소 활성도에 대한 pH의 영향

반응 혼합물을 pH 조건만 변화시키고 효소의 활성을 측정한 결과 최적반응 pH는 6.8-7.0이었다(Fig. 5). Nishikimi 등(1978)은 Baker's yeast의 L-galactonolactone oxidase가 pH 6.8에서 최대

Table 2. *Substrate specificity of L-galactonolactone oxidase isolated from S. cerevisiae.*

Substrate (2mM)	Relative activity (%)
L-Galactono-γ-lactone	100
L-Gulono-γ-lactone	31
D-Galactono-γ-lactone	0
D-Gulono-γ-lactone	0
D-Glucono-δ-lactone	0
D-Glucurono-γ-lactone	0

* The relative activities for the various sugar-acid lactones are shown. Activity is expressed in arbitrary units taking the activity of the substrate giving the highest value as 100.

활성을 보인다고 보고한 바 있다.

4. 기질 특이성

S. cerevisiae ATCC 26787로부터 부분정제한 L-galactonolactone oxidase는, 기질로 사용한 여러 종류의 sugar-acid lactone 중에서 L-glactono-1, 4-lactone과 L-gulono-1, 4-lactone만을 ascorbic acid로 산화시켰고, 특히 L-galactono-1, 4-lactone에 대해 특이적으로 작용 하였다 (Table 2).

Nishikimi 등(1978)에 의해 baker's yeast로부터 분리된 L-galactonolactone oxidase나 Nishikimi 등(1976)에 의해 쥐로부터 분리된 L-gulonolactone oxidase는 L-gulono-1, 4-lactone을 기질로 사용할 수 있으나, cauliflower(Mapson 등, 1958)의 L-galactonolactone dehydrogenase와 Bleeg 등(1982)에 의해 baker's yeast의 L-galactonolactone oxidase의 경우에 있어서는 L-gulono-1, 4-lctone이 효소 저해제(inhibitor)로 작용한다고 보고되었다. 따라서 본 실험에서 부분정제한 효소는 기질 특이성의 면에서 동물의 경우와 유사하다.

한편, L-galactono-1, 4-lactone에 대한 L-galactonolactone oxidase의 Km 값은 0.294 mM 이었다(Fig. 6).

적 요

Saccharomyces cerevisiae ATCC 26787에서 L-ascorbic acid 합성의 마지막 단계를 촉매하는 L-galactonolactone oxidase를 Triton X-100 처리, protamine sulfate 분획, ammonium sulfate 분획, DEAE-Sepharose CL-6B에 의한 이온교환 chromatography, Sephadex G-150에 의한 gel filtration chromatography, Phenyl-Sepharose CL-4B에 의한 hydrophobic interaction chromatography의 단계를 통하여 부분정제 하였다.

이 효소의 최적 반응온도는 34℃ 근방, 최적 반응 pH는 6.8-7.0으로 나타났다. 기질로 사용된 L-galactono-1, 4-lactone에 대한 이 효소의 Km 값은 0.294 mM 이었다. L-Gulono-1, 4-lactone도 기질로 작용할 수 있는데, 이러한 기질 특이성으로 보아 이 효소는 식물에서 발견되는 L-galactonolactone dehydrogenase 보다는 동물에서 발견되는 L-gulonolactone oxidase와 유사하다 할 수 있다.

사 사

본 논문은 한국과학재단 국제공동연구비로 진행되었다.

REFERENCES

1. Baig, M.M., S. Kelly, and F.A. Loewus, 1970. L-Ascorbic acid biosynthesis in higher plants from L-gulono-1,4-lactone and L-galactono-1,4-lactone. *Plant Physiol.* **46,** 277-280.
2. Bleeg, H.S., 1966. L-Ascorbic acid in yeast and isolation of L-galactono-γ-lactone oxidase from mitochondria. *Enzymologia* **31,** 105-112.
3. Bleeg, H.S., and F. Christensen, 1982. Biosynthesis of ascorbate in yeast. *J. Biochem.* **127,** 391-396.
4. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248-254.
5. Cameron, E., L. Pauling, and B. Leibovitz, 1979. Ascorbic acid and cancer: A review. *Cancer Research* **39,** 391-396.
6. Grün, M., and F.A. Loewus, 1984. L-Ascorbic acid biosynthesis in the euryhaline diatom *Cyclotella cryptica. Planta* **160,** 6-11.
7. Heick, H.M.C., G.L.A. Graff, and J.E.C. Humpers, 1972. Occurrence of ascorbic acid among the yeasts. *Can. J. Microbiol.* **18,** 598-600.
8. Helsper, J.P., L. Kagan, C.L. Hilby, T.M. Mayanard, and F.A. Loewus, 1982. L-Ascorbic acid biosynthesis in *Ochromonas danica. Plant Physiol.* **69,** 465-468.
9. Hewitt, E.J., and G.J. Dickes, 1961. Spectro-

photometric measurements on ascorbic acid and their use for the estimation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant tissues. *Biochem. J.* **78,** 384-391.

10. Kenney, W.C., D.E. Edmondson, T.P. Singer, H. Nakagawa, A. Asano, and R. Sato, 1976. Identification of the covalently bound flavin of L-gulono-γ-lactone oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71,** 1194-1200.
11. Kenney, W.C., D.E. Edmondson, T.P. Singer, M. Nishikimi, E. Noguchi, and K. Yagi, 1979. Identification of the covalently bound flavin of L-galactonolactone oxidase from yeast. *FEBS Lett.* **97,** 40-42.
12. Leung, C.T., and F.A. Loewus, 1985. Concerning the presence and formation of ascorbic acid in yeasts. *Plant Science* **38,** 65-69.
13. Loewus, F.A., 1971. Carbohydrate interconversions. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **22,** 337-364.
14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193,** 265-275.
15. Mapson, L.W., and E. Breslow, 1958. Biological synthesis of L-ascorbic acid. L-galactono-γ-lactone dehydrogenase. *Biochem. J.* **68,** 395-406.
16. Nishikimi, M., E. Noguchi, and K. Yagi, 1978. Occurrence in yeast of L-galactonolactone oxidase which is similar to a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis in animals, L-gulonolactone oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **191,** 479-486.
17. Nishikimi, M., K. Kiuchi, and K. Yagi, 1977. Detection of L-gulono-γ-lactone oxidase on SDS-polyacrylamide gels by the fluorescence of its covalently bound flavin. *FEBS Lett.* **81,** 323-325.
18. Renstrøm, B., M. Grün, and F.A. Loewus, 1982/1983. Biosynthesis of L-ascorbic acid in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Science Lett.* **28,** 299-305.
19. Shigeoka, S., Y. Nakano, and S. Kitaoka, 1979. The biosynthetic pathway of L-ascorbic acid in *Euglena gracilis* Z. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **25,** 299-307.
20. Takahashi, T., H. Yamashita, E. Kato, M. Mitsumoto, and S. Murakawa, 1976. Purification and some properties of D-glucono-γ-lactone dehydrogenase, D-erythroascorbic acid producing enzyme of *Penicillium cyaneofulvum*. *Agric. Biol. Chem.* **40,** 121-129.
21. Zannoni, V., M. Lynch, S. Goldstein, and P. Sato, 1974. A rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissues. *Biochem. Med.* **11,** 41-48.

(Received Jan. 23, 1988)