

Ascorbic Acid와 Pyrophosphate로부터 Ascorbic Acid-2-Phosphate의 효소적 생산

최현일 · 이상협 · 방원기*
고려대학교 자연자원대학 농화학과

Enzymatic Production of Ascorbic Acid-2-Phosphate from Ascorbic Acid and Pyrophosphate. Hyun-II Choi, Sang-Hyeob Lee and Won-Gi Bang*. *Department of Agricultural Chemistry, College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea* - Microorganisms capable of producing ascorbic acid-2-phosphate (AsA2P) from ascorbic acid (AsA) and pyrophosphate (PPi) were screened from the culture collection of this laboratory. Among them, *Cellulomonas* sp. AP-7 showed the highest productivity of AsA2P. The optimal conditions for the production of AsA2P from AsA and PPi with cell-free extract as an enzyme source were investigated. The reaction mixture for the maximal production of AsA2P consisted of 21 g protein of cell-free extract per liter as the enzyme source, 250 mM AsA, 200 mM sodium pyrophosphate, 150 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). By using this reaction mixture, 31.9 mM of AsA2P, which corresponded to a 12.76% yield based on AsA, was produced after incubation of 48 hr at 33°C.

Ascorbic acid(이하 AsA)는 의약품, 식품, 화장품 등의 분야에서 광범위하게 사용되나, 열이나 산화적 분해에 민감하다. 이러한 단점을 해결하기 위해 검토된 AsA의 유도체(1-3) 중에서, ascorbic acid-2-phosphate(이하 AsA2P)는 열이나 산화적 분해에 뚜렷한 안정성을 가지며, 생체 내에서 효소적 탈인산화 반응에 의해 쉽게 AsA로 전환되어 비타민 C의 활성이 복원된다(4-6). 또한, AsA2P는 화장품 원료로서 실용화되어 있고(7), 식품 및 사료 첨가물로서의 이용 가치가 높으며(8, 9), 적혈구의 보존 기간을 연장하는데도 효과적인 것으로 보고되어 있다(10).

AsA2P는 화학적 또는 효소적 방법으로 제조되고 있으나, 화학적 방법으로는 AsA의 2번 탄소의 수산기를 선택적으로 인산화하기 어렵고, 수율이 낮아 경제성이 낮은 것으로 평가되고 있으며(11-13), 효소적 인산화법은 특이성이 높기 때문에 많은 장점을 가질 것으로 기대되고 있다. 현재, 미생물에 의한 AsA2P의 효소적 생산에 대해 다수의 보문이 보고되어 있다(14-16).

본 연구에서는 AsA의 2번 탄소의 수산기를 선택적으로 인산화할 수 있는 미생물을 본 실험실의 보관 균주 중에서 선별한 후, 효소원으로 무세포 추출물을 이용하여 AsA와 pyrophosphate(이하 PPi)로부터 AsA2P를 생산하기 위한 최적 반응 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

*Corresponding author.

Key words: *Cellulomonas* sp., ascorbic acid, ascorbic acid-2-phosphate, pyrophosphate

본 실험실에서 보존 중인 균주들로부터 AsA2P를 생산하는 균주를 선별한 결과, AsA2P 생산능이 가장 우수한 *Cellulomonas* sp. AP-7을 계속적인 실험에 사용하였다. 균주의 전배양 및 본배양에는 1% polypeptone, 0.7% meat extract, 0.5% yeast extract, 0.3% NaCl 그리고 1% glycerol로 구성된 배지(pH 7.2)를 사용하였다. 상기 배지에 1.5%(w/v) 한천이 포함된 사면 배지를 균주의 보존, 계대 배양 그리고 균주의 선별에 사용하였다.

균주의 선별

AsA를 인산화하는 활성을 지닌 균주를 선별하기 위해, 본 실험실에서 분리, 보관 중인 균주를 10 ml의 상기 배지를 함유하는 25 ml 시험관에 한 백금이 접종하여 30°C에서 24시간 동안 진탕 배양(200 rpm)하여 전 배양물로 하였다. 본배양은 상기 배지를 50 ml 함유하는 500 ml Erlenmyer flask에 전배양물을 1 ml 접종한 후 30°C에서 24 시간 진탕 배양(200 rpm)하였다. 상기 배양액을 4°C에서 30분간 원심분리(7,000×g)하여 균체를 회수하였다. 수확한 균체 50 mg에 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5), 100 mM AsA, 100 mM sodium pyrophosphate(이하 Na-PPi) 그리고 0.06%(v/v) Triton X-100으로 구성된 반응 혼합물 1 ml를 첨가하여 30°C에서 24시간 동안 정치 반응시켰다. 반응액 내의 AsA2P의 생성 유무를 조사하기 위해, 반응액을 4°C에서 10분간 원심분리(10,000×g)한 다음, 상등액을 TLC 및 HPLC로 분석하여 AsA2P 생성능이 우수한 균주를 선별하였다.

무세포 추출물에 의한 전환 반응

전기와 같이 회수한 균체를 25 mM Tris·HCl buffer (pH 7.5)로 2회 세척한 후 -80°C 에서 보관하였다. AsA로부터 AsA2P를 생산하기 위해, 생균체 1 g에 1 ml의 비율로 20 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)를 첨가하여 현탁한 후, sonicator(서일 Ultrasonics 社)로 30 초의 간격으로 7분간 초음파분쇄하여 원심분리(30분, $15,000\times g$)한 다음, 상등액을 취하여 AsA2P 생산을 위한 효소원으로 사용하였다. AsA2P 생산을 위해 50 mM sodium acetate(pH 4.5), 50 mM AsA 그리고 50 mM Na-PPi로 구성된 혼합물을 기본 반응 혼합물로 사용하였다.

Ascorbic acid-2-phosphate의 분석 및 활성 측정

반응액에 축적된 AsA2P는 전개 용매로 *n*-butanol-acetic acid-water(5 : 2 : 3, v/v)를 이용하여 TLC(Silica gel 60F plate, Merck 社)로 확인하였으며(17), HPLC(Waters 社, Model 510)을 사용하여 정량하였다(15). 정량분석에는 ODS C₁₈ 칼럼(Showa Denko 社, Shodex C18-10B)을 이용하였으며, 용출계로는 100 mM KH₂PO₄ 용액(pH 3.0, 유속 1 ml/min)을 사용하였고, 그리고 254 nm에서의 UV 흡광도를 측정하였다.

AsA 인산화 효소의 1 단위는 30°C , pH 4.5에서 1분당 AsA로부터 1 nmole의 AsA2P를 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였으며, 비활성은 mg 생세포당 효소 활성의 단위수로 정의하였다. 무세포 추출물의 단백질 양은 bovine serum albumin을 표준 물질로 한 BCA 법(18)을 이용하여 측정하였다. 균의 생육은 분광광도계(LKB 社, Novaspec II)를 사용하여 600 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

Table 1. Comparisons of growth and productivity of ascorbic acid-2-phosphate

Strain	Growth (OD at 600 nm)	AsA2P (mM)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3918	5.5	0.04
<i>Micrococcus flavus</i> IFO 3242	21.4	0.71
<i>Micrococcus flavus</i> NCIB 8166	17.8	0.83
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IAM 1037	7.3	0.47
<i>Arthrobacter globiformis</i>	7.1	0.28
<i>Pseudomonas</i> sp. HL-026	10.3	0.04
<i>Pseudomonas</i> sp. BT306	13.3	0.08
<i>Cellulomonas</i> sp. AP-7	11.8	2.13

Reaction was carried out for 24 hr at 30°C in the reaction mixture containing 100 mg wet cell per ml, 100 mM ascorbic acid, 100 mM sodium pyrophosphate, and 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5).

결과 및 고찰

균주의 선별

AsA2P 생성능을 갖는 균주를 재료 및 방법에 따라 50여종을 확인하였으며, 이 중 AsA2P 생성능이 비교적 우수한 균주 8종을 선별하였다. Table 1에와 같이, 균의 생육은 *Micrococcus flavus* IFO 3242에서 가장 좋았으나, AsA2P의 생산성은 *Cellulomonas* sp. AP-7이 가장 우수하였다. 따라서, *Cellulomonas* sp. AP-7을 AsA와 PPi로부터 AsA2P의 생산을 위한 계속적 실험에 사용하였다.

균체의 증식 및 효소 활성의 경시적 변화

AsA 인산화 활성이 최대인 균체를 수확하기 위해 균의 생육에 따른 효소 활성의 경시적 변화를 조사하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 효소 활성은 *Cellulomonas* sp. AP-7의 생육과 함께 증가하다가 균의 생육이 정지기에 들어서면서 감소되는 경향을 나타내었다. 배양 개시 후 16시간째에 비활성은 최고값인 0.093 nmole/min/mg wet cell에 도달하였다. 한편, Fig. 1으로부터 최대 비증식속도(μ_{\max})는 0.436 hr^{-1} 이었으며, 증배시간(t_d)은 1시간 35분이었다. 따라서, 효소의 비활성이 최대인 배양 16시간째에 균체를 수확하여 무세포 추출물의 제조에 사용하였다.

균체와 효소에 의한 AsA2P의 생산 비교

Cellulomonas sp. AP-7의 휴지 세포와 무세포 추출물을 이용하여 AsA와 PPi로부터 AsA2P의 생산을 비교하였다. 휴지 세포를 이용한 경우에는 균체의 막 투

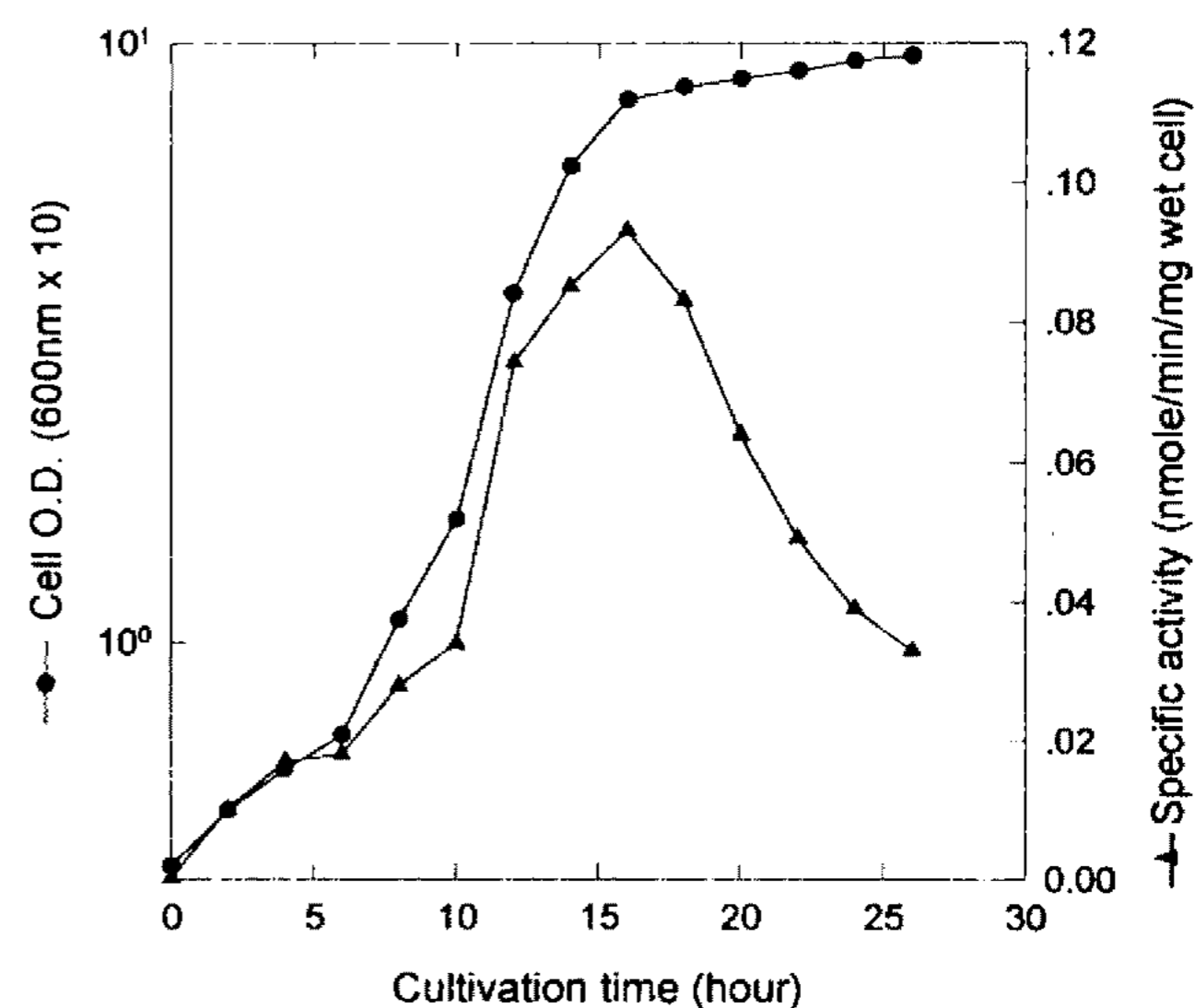


Fig. 1. Growth curve of *Cellulomonas* sp. AP-7 and change in ascorbic acid phosphorylating activity.

Cultivation was carried out at 30°C as described in Material and Methods. Reaction was carried out for 16 hr at 30°C in the reaction mixture containing 50 mM AsA, 100 mM PPi and 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5).

Table 2. Ascorbic acid-2-phosphate production by various enzyme preparations

Enzyme source	AsA2P (mM)
Cell-free extract	3.48
Whole cells	2.81
Detergent-treated cells	
SDS treated	3.12
CTAB treated	2.49
Triton X-100 treated	2.69
Tween 60 treated	2.81

CTAB; cetyltrimethyl ammonium bromide, SDS; sodium dodecyl sulfate.

Reaction was carried out for 24 hr at 30°C in the reaction mixture (Table 1).

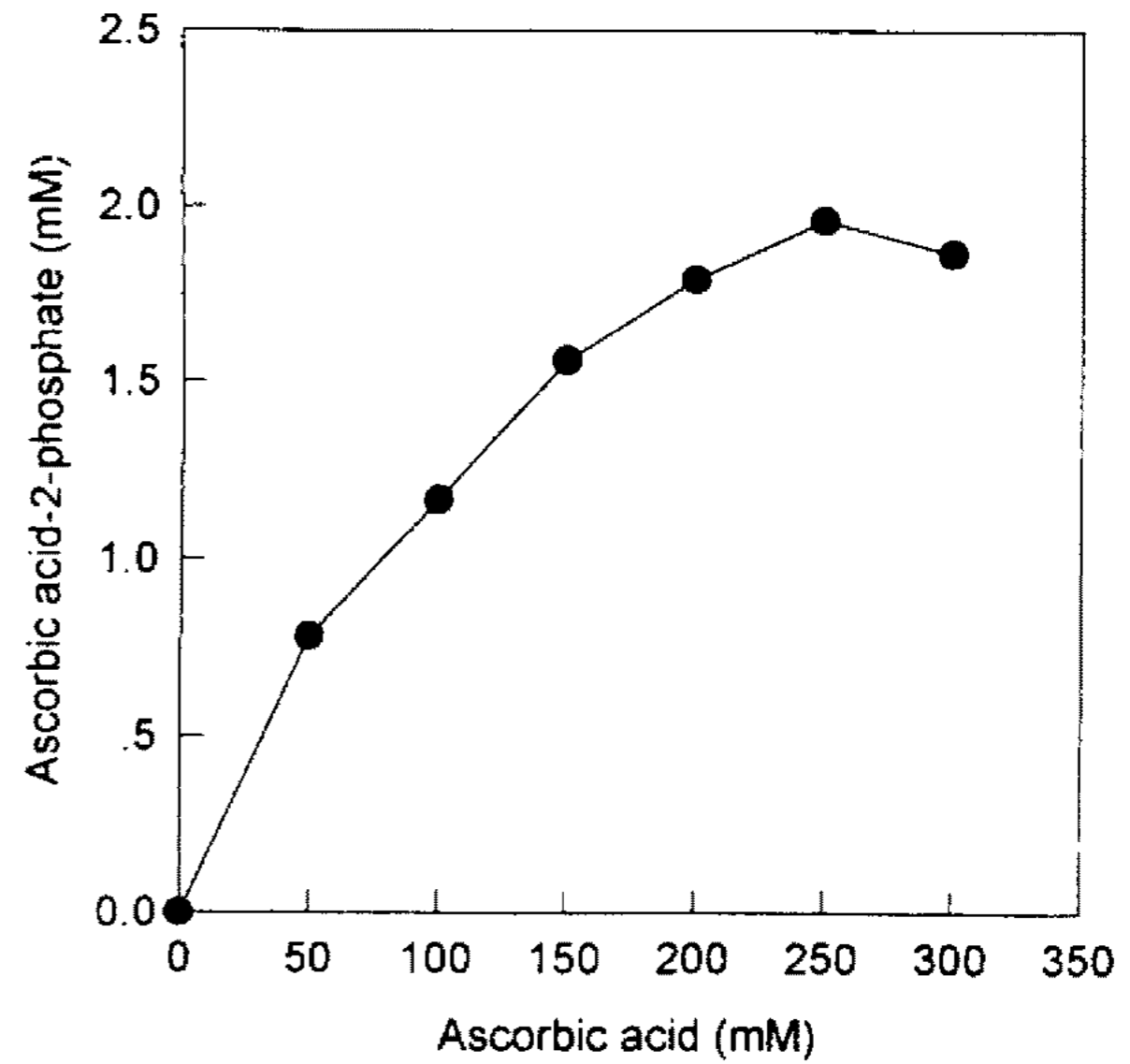
Crude extract containing 6.7 mg protein/ml is equal to 50 mg wet cells.

과성을 고려하여 계면활성제 처리구와 비처리구를 비교 검토하였다. Table 2에서 보는 바와 같이, AsA2P의 생산은 무세포 추출물을 사용했을 때 가장 좋았으며, 휴지 세포를 사용한 경우에 SDS로 처리한 처리구에서 다소 생산량의 증가를 보였으나, 그 밖의 처리구에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서, 효소원으로 무세포 추출물을 제조하여 지속적인 실험에 사용하였다.

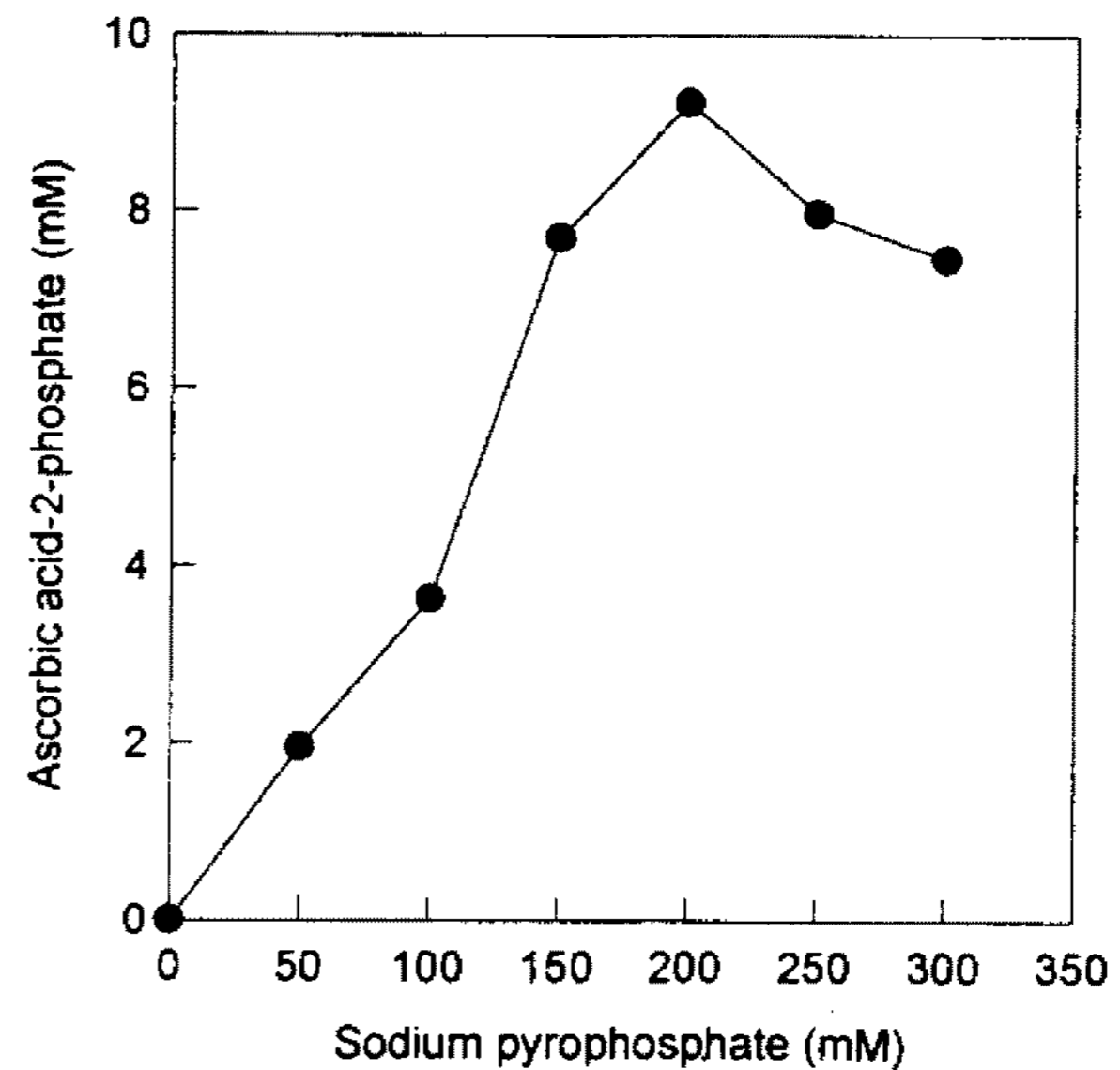
무세포 추출물에 의한 AsA2P의 생산

AsA2P 생산에 미치는 AsA 농도와 PPI의 영향을 조사하기 위해, 기본 반응 혼합물의 PPI 농도와 AsA 농도를 50 mM로 고정하고 AsA와 PPI의 농도를 50 mM부터 300 mM까지 변화시키면서 AsA2P의 생산량을 비교 검토하였다. Fig. 2의 결과와 같이, AsA2P 생산량은 AsA 농도가 증가함에 따라 250 mM까지는 점차적으로 증가하는 경향을 보였으나, 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 한편, PPI 농도가 AsA2P 생산에 미치는 영향을 관찰한 결과 Fig. 3과 같이, AsA의 경우와 유사하게 PPI 농도가 200 mM일 때 AsA2P 생산이 최대에 도달한 후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과로부터, 반응 혼합액의 AsA와 PPI의 농도를 250 mM과 200 mM로 고정하여 지속적인 실험에 사용하였다.

효소원의 단백질 농도가 AsA2P 생산에 미치는 영향을 검토하기 위해, 무세포 추출물의 단백질 농도를 7 mg/ml부터 42 mg/ml까지 변화시키면서, AsA2P의 생산량을 조사하였다. Fig. 4의 결과와 같이, 단백질 농도가 21 mg/ml에 이를 때까지는 AsA2P 생산량도 단백질 농도의 증가와 함께 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 포화되는 경향을 나타내었다. 따라서, AsA2P를 생산하기 위한 최적 효소원의 단백질 농도는 21 mg/ml이었으며, 이상의 조건하에서 24시간 반응 후, 16.7 mM

**Fig. 2.** Effect of ascorbic acid concentrations on the production of ascorbic acid-2-phosphate by cell-free extract of *Cellulomonas* sp. AP-7.

Reaction was carried out for 24 hr at 30°C in the reaction mixture containing said ascorbic acid, 50 mM Na-pyrophosphate, 7 mg protein/ml of cell-free extract, and 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5).

**Fig. 3.** Effect of sodium pyrophosphate concentrations on the production of ascorbic acid-2-phosphate by cell-free extract of *Cellulomonas* sp. AP-7.

Reaction was carried out for 24 hr at 30°C in the reaction mixture containing said sodium pyrophosphate, 50 mM ascorbic acid, 7 mg protein/ml of cell-free extract, and 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5).

의 AsA2P가 생산되었다.

AsA2P 생산에 미치는 완충제의 영향을 조사하기 위해, 일반적으로 산성에서의 완충 작용에 사용되는 4 가지 완충 용액을 조제하여 반응에 사용하였다. Table 3의 결과와 같이, AsA2P 생산에는 sodium acetate를

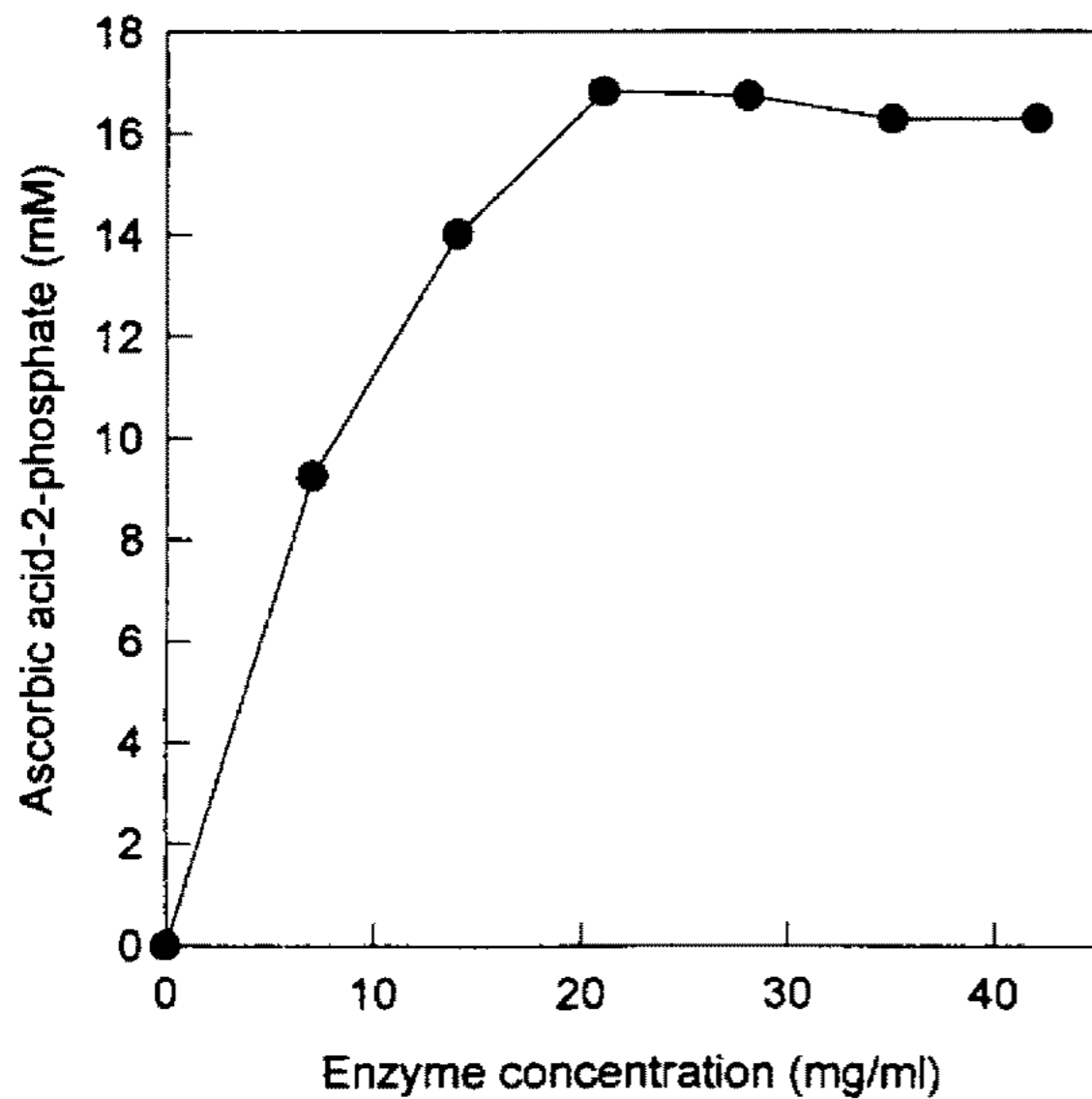


Fig. 4. Effect of enzyme concentrations on the production of ascorbic acid-2-phosphate by cell-free extract of *Cellulomonas* sp. AP-7.

Reaction was carried out for 24 hr at 30°C in the reaction mixture containing said enzyme, 250 mM ascorbic acid, 200 mM Na-pyrophosphate, and 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5).

Table 3. Effect of various buffers on the production of ascorbic acid-2-phosphate by cell-free extract of *Cellulomonas* sp. AP-7

Buffer	Ascorbic acid-2-phosphate (mM)
Sodium acetate	16.71
Sodium formate	15.41
Sodium succinate	14.50
Sodium citrate	10.47

Reaction was carried out for 24 hr at 30°C in the reaction mixture containing 250 mM ascorbic acid, 200 mM Na-pyrophosphate, 21 mg protein/ml of cell-free extract and various buffers of 50 mM (pH 4.5).

사용한 완충제가 가장 효과적이고, sodium citrate는 가장 부적합한 것으로 판명되었다. 따라서, 반응액의 완충제로 sodium acetate를 선정하여 계속적인 실험에 사용하였다.

AsA2P 생산에 사용된 sodium acetate 완충제의 농도 변화에 따른 AsA2P의 생산량을 비교 검토한 결과, Table 4와 같이 AsA2P 생산량은 시험구간에 큰 차이는 없었으나, 150 mM의 sodium acetate를 사용하였을 때 가장 효율적이었다.

AsA2P의 생산에 미치는 반응 혼합액의 pH 영향을 검토하기 위해, 반응 혼합액의 pH를 3.5부터 5.5까지 변화시키면서 AsA2P 생성량을 비교 검토하였다. Fig. 5의 결과와 같이, AsA2P의 생산량은 pH 4.5에서 최대이었으며, 이 범위를 벗어나면 급격히 감소하는 경향을

Table 4. Effect of concentrations of sodium acetate buffer on the production of ascorbic acid-2-phosphate by cell-free extract of *Cellulomonas* sp. AP-7

Concentration (mM)	Ascorbic acid-2-phosphate (mM)
50	16.71
100	17.23
150	18.93
200	18.61

Reaction was carried out for 24 hr at 30°C in the reaction mixture containing 250 mM ascorbic acid, 200 mM sodium pyrophosphate, and 21 mg protein/ml of cell-free extract and various concentrations of sodium acetate buffer (pH 4.5)

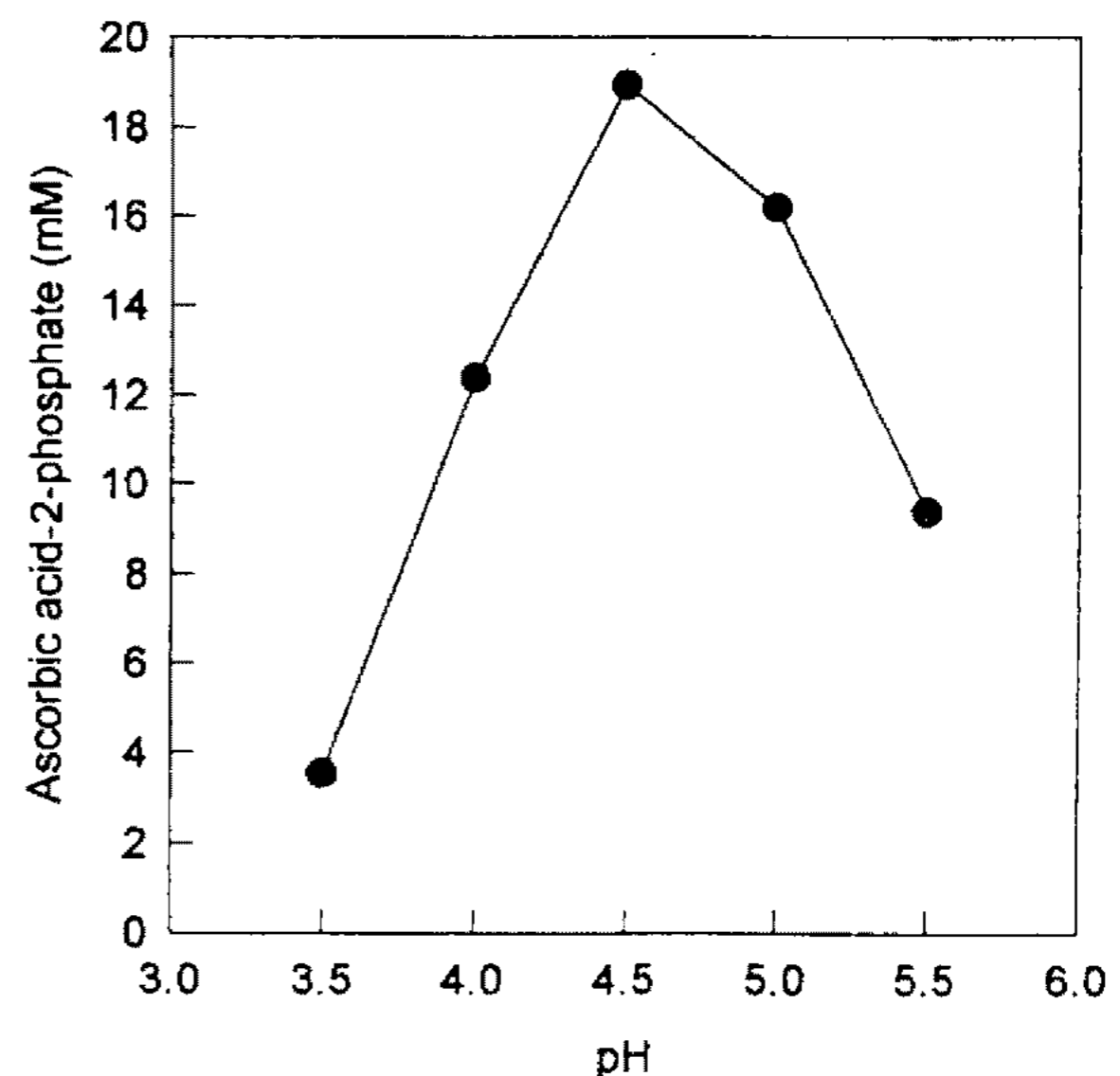


Fig. 5. Effect of pHs on the production of ascorbic acid-2-phosphate production by cell-free extract of *Cellulomonas* sp. AP-7.

Reaction was carried out for 24 hr at 30°C and various pHs in the reaction mixture containing 250 mM ascorbic acid, 200 mM sodium pyrophosphate, 21 mg protein/ml of cell-free extract, and 150 mM sodium acetate buffer.

보여, 본 반응은 강한 pH 의존성을 나타냄을 알 수 있었다. 상기 결과로부터, 반응 혼합액의 완충 용액으로는 pH 4.5의 150 mM sodium acetate를 사용하였다.

AsA2P 생산에 미치는 반응 온도의 영향을 조사하기 위해, 25~36°C 범위의 반응 온도 하에서 AsA2P 생산량을 비교 검토하였다. Table 5의 결과와 같이, AsA2P 생산량은 33°C까지는 반응 온도의 증가와 함께 증가하나, 36°C에서는 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

이상의 결과로부터 얻어진 최적 조건하에서 효소원으로 *Cellulomonas* sp. AP-7의 무세포 추출물을 사용하여 AsA와 PPI로부터 AsA2P 생산의 경시적 변화를 조사하였다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이, AsA2P 생산은 배양 48시간째까지는 계속적으로 증가하나, 그 이후로는

Table 5. Effect of reaction temperatures on the production of ascorbic acid-2-phosphate by cell-free extract of *Cellulomonas* sp. AP-7

Temperature (°C)	Ascorbic acid-2-phosphate (mM)
25	17.66
30	18.93
33	26.55
36	24.50

Reaction was carried out for 24 hr at various temperatures in the reaction mixture containing 250 mM ascorbic acid, 200 mM Na-pyrophosphate, 21 mg protein/ml of crude extract, and 150 mM sodium acetate buffer (pH 4.5).

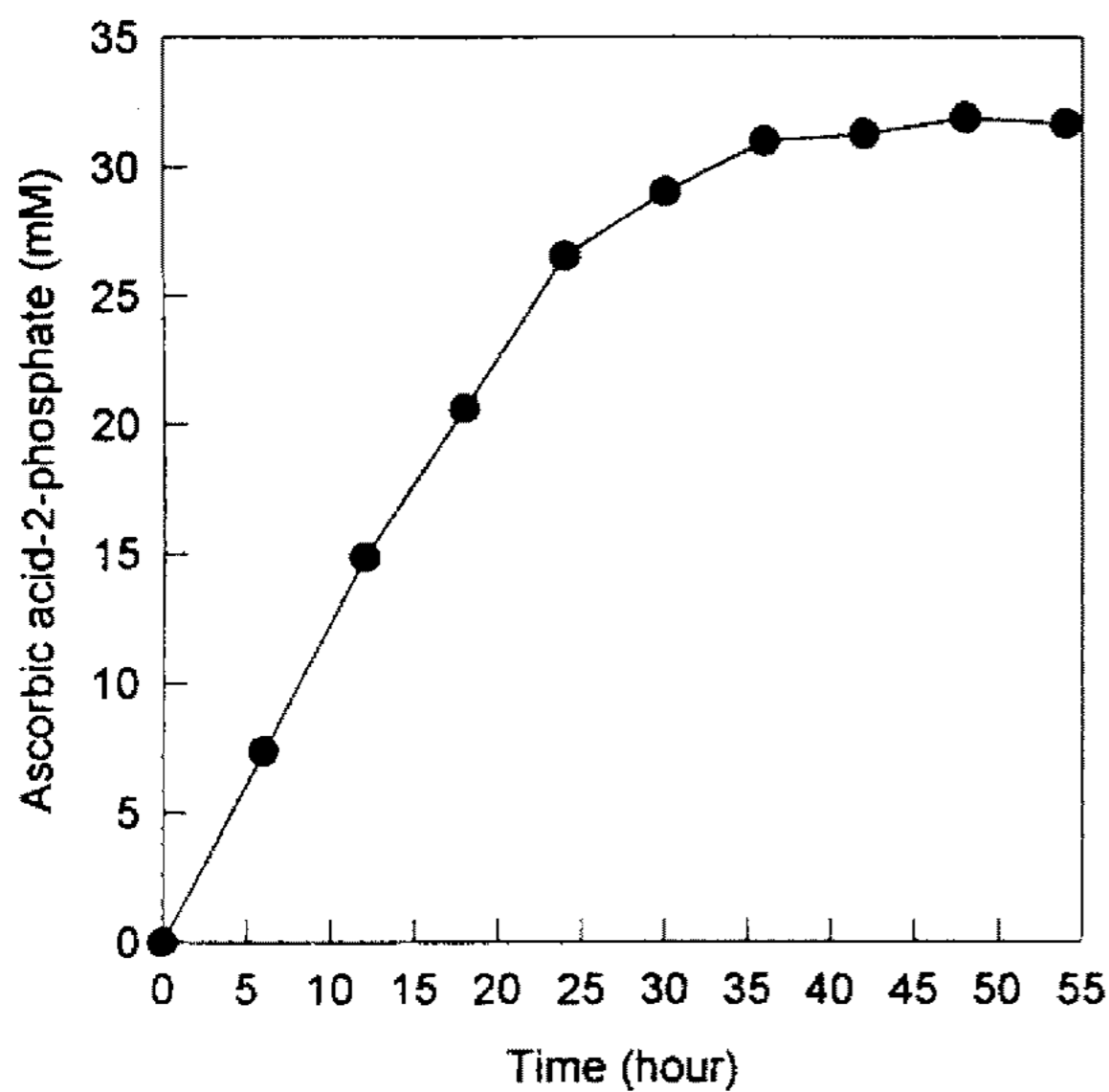


Fig. 6. Time course of ascorbic acid-2-phosphate production by cell-free extract of *Cellulomonas* sp. AP-7.

Reaction was carried out for 24 hr at 33°C in the reaction mixture containing 250 mM ascorbic acid, 200 mM Na-pyrophosphate, 21 mg/protein/ml of cell-free extract, and 150 mM sodium acetate buffer (pH 4.5).

포화되는 경향을 나타내었다. 반응 48시간째의 AsA2P 생산량은 31.9 mM이었으며, 이는 AsA에 대해 12.76%의 수율에 해당하는 결과이었다.

다양한 미생물이 AsA와 인산 공여체로부터 AsA2P를 생산할 수 있는 것으로 알려져 있으나, 대표적인 생산 예로서 Maruyama 등(15)은 *Pseudomonas azotocolligans*를 이용하여 30 mM AsA와 40 mM ATP로부터 3.7 mM의 AsA2P의 생산을 보고하고 있으며, Fujio 등(14)도 *Pseudomonas* 속과 *Cellulomonas* 속에 속하는 미생물을 이용하여 200 mM AsA와 200 mM potassium pyrophosphate로부터 32.1~35.1 mM의 AsA2P를 생산하였다고 보고하고 있다. 본 연구에서 얻어진 결과를 이들과 비교해 볼 때, 분리 균주 *Cellulomonas* sp. AP-7은 AsA와 PPI로부터 AsA2P의 생산에 있어서 잠재적 가치를 가질 것으로 생각된다.

요 약

Ascorbic acid(AsA)와 pyrophosphate로부터 ascorbic acid-2-phosphate(AsA2P)를 생산할 수 있는 미생물을 본 실험실에서 분리한 보존 균주로부터 선별하였다. 선별 균주 중에서 *Cellulomonas* sp. AP-7이 가장 높은 AsA2P 생산능을 나타내었다. 효소원으로 본 균주의 무세포 추출물을 이용하여 AsA와 PPI로부터 AsA2P의 최적 생산 조건을 조사하였다. AsA2P의 최적 생산을 위한 반응 혼합액은 효소원으로 21 mg/ml의 무세포 추출물, 150 mM sodium acetate 완충액(pH 4.5), 기질로 250 mM AsA 그리고 인산 공여체로 200 mM PPI로 조성되었으며, 이 반응 혼합액을 사용하여 33°C에서 48 시간 반응시켰을 때, 31.9 mM의 AsA2P가 생산되었으며, 이는 반응에 사용한 AsA에 대해 12.76%의 수율에 해당하였다.

감사의 말

본 연구는 1994년도 과학기술처 선도기술과제(BNS 81480-754-2)의 위탁연구로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Tsao, C.S. and M. Young. 1985. Analysis of ascorbic acid derivatives by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **330**: 408-411.
2. Seib, P.A., Y.T. Liang, C.H. Lee, R.C. Hosency, and C.W. Deyo. 1974. Synthesis and stability of L-ascorbate 2-sulfate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 1220-1224.
3. Muto, N., T. Nakamura, and I. Yamamoto. 1990. Enzymatic formation of a non-reducing L-ascorbic acid α -glucoside: purification and properties of α -glucosidase catalyzing site-specific transglucosylation from rat small intestine. *J. Biochem.* **107**: 222-227.
4. Machlin, L.J., F. Garcia, W. Kuenzig, and M. Brin. 1979. Antiscorbutic activity of ascorbic acid phosphate in the rhesus monkey and the guinea pig. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**: 325-333.
5. Imai, Y., Y. Usui, T. Matsuzaki, H. Yokotani, H. Mima, and Y. Aramaki. 1967. The antiscorbutic activity of L-ascorbic acid phosphate given orally and percutaneously in Guinea pigs. *Jap. J. Pharmacol.* **17**: 317-324.
6. Mima, H., H. Nomura, Y. Imai, and H. Takashima. 1970. Chemistry and application of ascorbic acid phosphate. *Vitamins (Japan)*. **41**: 387-398.
7. Takashim, H., H. Nomura, Y. Imai, and H. Mima. 1971. Ascorbic acid esters and skin pigmentation. *Am. Perf. Cosmet.* **86**: 29-36.
8. El Naggat, G.O. and R.T. Lovell. 1991. L-Ascorbyl 2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as

- L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish. *J. Nutr.* **121**: 1622-1626.
9. 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.
 10. Moore, G.L., M.E. Ledford, and M.R. Brummell. 1981. Improved red blood cell storage using optional additive systems (OAS) containing adenine, glucose and ascorbate-2-phosphate. *Transfusion.* **21**: 723-731.
 11. Nomura, H., T. Ishiguro, and K. Maeda. 1972. Method for production of ascorbic acid-3-phosphate. US Patent 3,658,848.
 12. Sekine, M., T. Futatsugi, and T. Hata. 1982. Silyl phosphites. 21. A new method for the synthesis of L-ascorbic acid 2-O-phosphate by utilizing phosphoryl rearrangement. *J. Org. Chem.* **47**: 3453-3456.
 13. Hinkely, D.F. 1972. Process for preparing ascorbyl-3-phosphate and salts thereof. US patent 3,671,549.
 14. Fujio, T., A. Maruyama, and S. Koizumi. 1989. Enzymic preparation of ascorbic acid-2-phosphate. Eur. Pat. Appl. EP 319130.
 15. Maruyama, A., S. Koizumi, and T. Fujio. 1990. Enzymatic production of ascorbic acid-2-phosphate. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2309-2313.
 16. 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.
 17. Bensinger, T.A., T.F. Zuck, B. Tolbert, S. Mclaughlin, K. Aguirre, C.C. Peck, and M. Knight. 1978. An enzymatic method for measurement of ascorbate-2-phosphate. *Biochem. Med.* **19**: 118-126.
 18. 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.

(Received 18 July 1996)