

Pseudomonas sp.에 의한 Ascorbic acid로부터 Ascorbic acid-2-phosphate의 생산

권기성 · 이상협 · 방원기*
고려대학교 자연자원대학 응용생명환경화학과

Production of Ascorbic acid-2-phosphate from Ascorbic acid by *Pseudomonas* sp.. Kwon, Ki Sung, Sang-Hyeob Lee, and Won-Gi Bang*. Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea - In order to produce ascorbic acid-2-phosphate from ascorbic acid, bacteria capable of transforming ascorbic acid to ascorbic acid-2-phosphate were isolated from soils and the stock cultures in our laboratory. Among them, a newly isolated bacterium LSH-3 having the best ability of producing ascorbic acid-2-phosphate was selected and partially identified as *Pseudomonas* sp. The optimum conditions for the production of ascorbic acid-2-phosphate from ascorbic acid and using its resting cells as the source of enzyme were investigated. The results were summarized as follows: The optimum cultivation time and the cell weight for the production of ascorbic acid-2-phosphate was 14 hours and 100 g/l(wet weight), respectively. And 0.1%(v/v) Triton X-100 was the most effective surfactant. The optimum concentrations of ascorbic acid and pyrophosphate were 400 mM and 500 mM, respectively, which led to produce 14.54 g/l of ascorbic acid-2-phosphate. The most effective buffer was 50 mM sodium acetate. The optimum pH and temperature were 4.5 and 40°C, respectively. Under the above conditions, 17.71 g/l of ascorbic acid-2-phosphate was produced from ascorbic acid after 32 hour-incubation, which corresponded to 17.5% of conversion rate based on ascorbic acid.

Key words: ascorbic acid-2-phosphate, *Pseudomonas* sp, resting cell

L-Ascorbic acid(vitamin C)는 항괴혈 활성이외에 환원력을 가져 의약품, 식품첨가제, 화장품, 산화방지등 여러 가지 목적에 광범위하게 사용되는 천연계에 널리 존재하는 화합물이다. 이러한 ascorbic acid는 공기 중에서는 상대적으로 안정하나 수용액 상태에서는 빠르게 산화된다. 특히 수용액 내에 Cu^{2+} 와 같은 소량의 중금속 이온 등이 존재하면 산화가 더욱 가속화되고[4, 8, 12] 산소, 고온, 금속 이온 및 몇몇 효소와 같은 인자들에 의해 분해되기 쉬워 그 가치를 현저히 저하시키는 원인이 된다[4]. 그러나 ascorbic acid의 유도체인 ascorbic acid-2-phosphate(AsA2P)는 열이나 산화적 분해에 현저한 안정성을 가지며 수용액 상태에서도 매우 안정하다고 알려져 있으나 천연계에서는 아직 그 존재가 발견되지 않고 있다[9]. AsA2P는 그 인산에스테르를 분해하는 phosphatase가 동물의 소화계와 피부에서 발견되고 있으며 phosphatase에 의해 신속하게 가수분해를 받아 L-ascorbic acid가 유리되어 생체내에서 유효한 vitamin C의 활성을 복원한다[7,10]. 현재 AsA2P는 어류 양식에서 사료의 가공과 저장중에 50%이상이 불활성화되거나 소실되는 ascorbic acid의 대체물로서 이용되고 있을 뿐만 아니라, 식품 첨가물과化粧품의 원료

로서 실용화되어 있다[3, 11, 13].

본 연구에서는 ascorbic acid를 인산화할 수 있는 미생물을 토양으로부터 분리하여, 분리한 균주의 휴지세포를 직접 효소원으로 하여 ascorbic acid와 인산 공여체로부터 ascorbic acid-2-phosphate를 생산하기 위한 최적 반응조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 시약

본 실험실에서 보유중인 공시균주들과 토양분리균주들로부터 ascorbic acid-2-phosphate 생산량이 가장 좋은 균주를 선별하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 L-ascorbic acid는 Showa chemical사의 특급 시약을 사용하였으며, AsA2P는 Wako Pure chemical사의 특급 시약을 사용하였고, ATP, ADP, acetyl phosphate, disodium pyrophosphate등은 Sigma사의 특급 시약을 사용하였다. 균주의 배양에 사용된 배지는 Difco사로부터 구입하여 사용하였으며, 그 밖의 일반시약은 모두 Showa chemical 및 Junsei사의 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

균주의 배양 및 반응조건

선별된 균주를 한천 평판배지에 한 백금이 접종하여 30°C에서 36시간 배양한 후, 균락으로부터 LB배지 5 ml를

*Corresponding author
Tel. 82-2-3290-4030, Fax. 82-2-925-1970
E-mail: agrchem@kucn.korea.ac.kr

함유하고 있는 시험관에 한 백금이 접종하여 30°C에서 24시간 동안 진탕배양(200 rpm)하였다. 균체를 생산하기 위한 본배양은 LB배지 50 ml를 함유하고 있는 500 ml Erlenmyer flask에 전배양액을 2%(v/v)가 되도록 접종한 후 30°C에서 14시간 진탕배양(200 rpm)하였다. 이렇게 배양된 균체를 4°C에서 30분간 원심분리(7,000 × g)하고 0.9% 생리식염수로 2회 세척한 후 효소원으로 사용하였다. 상기 수확한 균체로 400 mM ascorbic acid, 400 mM disodium pyrophosphate, 50 mM sodium acetate pH 4.5 반응액을 사용하여 최적 반응조건을 검토하였다. 전환반응은 상기 조성의 반응액 및 효소원으로 사용된 균체를 함유하는 반응혼합액 10 ml를 30°C에서 24시간 반응한 후, 반응액 일부를 취하여 10분간 원심분리(7,000 × g)한 후 상등액을 분석용 시료로 사용하였다.

정성 및 정량분석

반응액내의 AsA2P를 정성적으로 확인하기 위하여 Bensinger 등[2]의 방법에 따라 TLC로 분석하였다. 반응액을 원심분리하여 상등액과 표준물질을 Silica gel 60 F plate(Merck사)에 각각 1 µl씩 점적한 후 n-butanol:acetic acid:water = 5 : 2 : 3(v/v)의 전개용매계를 사용하여 실온에서 1-2시간 동안 상행 전개시켰다. 전개후 dryer로 건조시킨 후 UV lamp(Ultra violet사, UVSL-58)로 plate상의 시료의 spot를 확인하여 표준 물질과 시료의 R_f값을 비교하였다. 반응액 내의 AsA2P를 정량적으로 확인하기 위하여 HPLC로 분석하였다. Tunable Absorbance UV Detector (Waters model 484)가 부착된 HPLC (Waters model 510)에 Shodex C₁₈컬럼(300 mm × 2 mm, Shoko)을 장치하여 분석하였으며, 전개용매로는 0.1 M potassium dihydrogen phosphate, pH 3.0을 유속 1.0 ml/min 사용하였다. 순수한 AsA2P를 사용하여 같은 머무름 시간의 peak를 비교하였다.

선별된 균주와 최종 선별 균주에 의한 AsA2P의 생산은 상기의 반응조건에서 수행하였으며, 그 양은 표준물질 AsA2P로부터 작성한 표준곡선으로부터 구하였다.

균체량 측정

균체의 생육은 spectrophotometer(LKB사, Novaspec II)를 사용하여 600 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

균주의 동정

분리 및 선별된 균주의 동정은 API 20 NE 동정용 키트를 [1] 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

Ascorbic acid-2-phosphate 생산 균주의 선별 및 동정

AsA2P를 생산하기 위하여 ascorbic acid와 인산기 공여체로부터 AsA2P로 전환하는 능력이 있는 미생물을 토양으로부터 분리하고자 하였다. 일반적으로 많은 미생물들이 ascorbic acid phosphorylating activity를 지니고 있는 것으로 보고되어[5] 있기 때문에 앞서 기술한 재료 및 방법에 따라 토양으로부터 분리된 약 60여종의 균주와 본 실험실에서 보관하고 있는 50여종의 균주를 5 ml LB 배지가 함유된 시험관에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 균체를 수확하여 200 mM ascorbic acid, 200 mM disodium pyrophosphate, 50 mM sodium acetate pH4.5, 30°C에서 24시간 반응후 원심분리하였다. 반응 상등액을 박층 크로마토그래피로 정성분석하여 표준물질 AsA2P와 시료의 R_f값이 동일한 토양균주 4종, 실험실 보관균주 6종을 선별하였다. 토양으로부터 선별된 균주들은 각각 LSH-1, LSH-2, LSH-3, LSH-4로 명명하였다. 선별된 균주들을 LB배지 50 ml에 2%(v/v)접종하여 30°C에서 16시간동안 배양한 후, 균체를 효소원으로 사용하여 400 mM ascorbic acid, 400 mM disodium pyrophosphate, 50 mM sodium acetate pH4.5, 30°C에서 24시간 반응을 수행하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 LSH-3균주가 다른 균주에 비하여 생육도 우수하며, AsA2P의 생산량이 1.93 g/l로서 가장 좋았다. 따라서 LSH-3을 본 실험에서 ascorbic acid로부터 AsA2P를 생산하기위한 균주로 최종 선별하였다. 분리균주인 LSH-3은 Gram음성의 간균으로 관찰되었으며, 운동성을 가지고 있었다. 동정용 API 20 NE 키트를 사용

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

Strains	Growth (O.D. 600 nm)	Ascorbic acid-2-phosphate (g/l)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
IFO 3918	8.13	0.12
<i>Micrococcus flavus</i>		
IFO 3242	8.47	0.56
<i>Micrococcus flavus</i>		
NCIB 8166	8.49	0.69
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
IAM 1037	4.66	0.41
<i>Arthrobacter globiformis</i>	8.50	0.25
<i>Cellulomonas</i> sp. AP-7	4.16	1.37
LSH-1	6.93	0.53
LSH-2	5.21	0.36
LSH-3	7.59	1.93
LSH-4	9.12	1.02

Reactions were carried out for 16hrs at 30°C in reaction mixture containing 100 g/l(wet weight) of cell concentration, 200 mM of ascorbic acid, 200 mM of pyrophosphate and 50 mM of sodium acetate buffer(pH 4.5).

하여 생리적 및 생화학적 성질을 조사한 후, 동정표를 사용하여 분석한 결과 LSH-3 균주는 *Pseudomonas* sp.로 부분 동정하였다.

Ascorbic acid-2-phosphate의 확인

본 실험에서 최종 선별되어 동정한 *Pseudomonas* sp. LSH-3에 의해 생성된 AsA2P는 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 박층 크로마토그래피 및 HPLC에 의해 정성적으로 확인하였다. 먼저 AsA2P 표준물질과 반응액 시료를 함께 박층 크로마토그래피로 분석한 결과 시료의 Rf값들은 표준물질 AsA2P 및 ascorbic acid의 Rf 0.37과 0.55에 각각 일치하였다. 따라서 반응액에는 ascorbic acid로부터 AsA2P가 생성됨을 알 수 있었다.

또한 반응액을 Shodex C₁₈ 칼럼을 이용하여 HPLC로 분석한 결과 AsA2P 표준 시료와 같은 3.6분대의 머무름 시간을 나타내어 생성물은 AsA2P임을 확인할 수 있었다.

세포의 증식속도와 배양시간에 따른 ascorbic acid phosphorylating activity의 경시적 변화

Ascorbic acid phosphorylating activity가 최대인 균체를 수확하기 위하여 시간의 경과에 따른 균체량과 상기의 반응 조건하에서 ascorbic acid phosphorylating activity의 변화를 비교하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 *Pseudomonas* sp. LSH-3의 생육은 배양 개시 16시간 후에 정지기에 도달하였다. Ascorbic acid phosphorylating

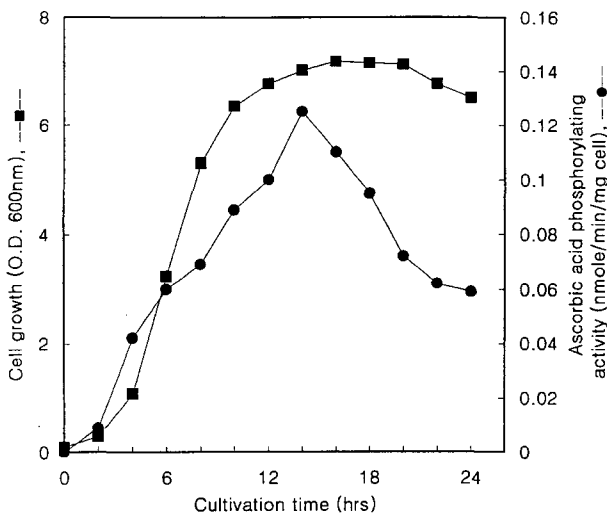


Fig. 1. Growth curve of *Pseudomonas* sp. LSH-3 and change in ascorbic acid phosphorylating activity. Cultivations were carried out at 30°C in LB medium. Reactions were carried out for 24hrs at 30°C in reaction mixture containing 100 g/l(wet weight) of cell concentration, 200 mM ascorbic acid, 200 mM pyrophosphate and 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.5).

activity는 14시간 후에 최대인 0.125 nmole/min/mg cell에 도달하였으며, 그후 점차 감소하였다. 따라서 이후의 실험에서는 비활성이 가장 높은 14시간 동안 배양한 균체를 수확하여 ascorbic acid에서 ascorbic acid-2-phosphate 생산을 위한 효소원으로 사용하였다.

균체량이 ascorbic acid-2-phosphate의 생산에 미치는 영향

Ascorbic acid에 대한 인산기 공여체로서 disodium pyrophosphate를 선정하여 실험을 수행하여 효소원으로 사용되는 균체량의 증가에 따른 AsA2P의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 생균체량이 100 g/l(wet weight)에 이르기까지는 AsA2P의 생산량이 증가하였으며, 이 때의 AsA2P의 생산량은 13.13 g/l이었다. 그러나, 그 이상의 균체량에서는 더 이상 증가하지 않았다. 따라서 이후의 실험에서는 100 g/l(wet weight)의 균체를 사용하였다.

Ascorbic acid-2-phosphate 생산에 미치는 유화제의 영향

일반적으로 유화제는 미생물의 막 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있다[6]. 따라서 반응혼합액에 양이온성, 음이온성 및 비이온성 유화제를 첨가하여 휴지세포에 의한 AsA2P생산에 미치는 첨가효과를 검토하였으며 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 유화제를 첨가하였을 때 전반적으로 생산량이 대조구보다 높았으나 비이온성 유화제인 Triton X-100 0.1%(v/v)를 첨가한 것이 가장 많은 AsA2P 생산량을 보였다. 따라서 이후의 실험에서는 유화제

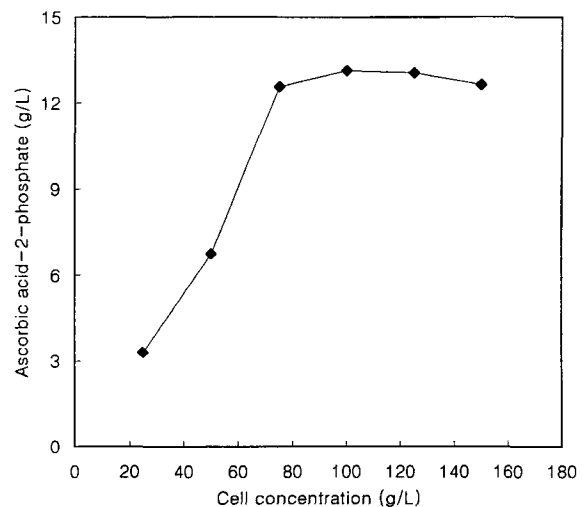


Fig. 2. Effect of cell concentration on ascorbic acid-2-phosphate production with resting cell. Reactions were carried out for 24hrs at 30°C in reaction mixture containing 400 mM of ascorbic acid, 400 mM of pyrophosphate and 50 mM of sodium acetate buffer(pH 4.5).

Table 2. Effect of different surfactants and its concentration on ascorbic acid-2-phosphate production with resting cell

Surfactant	Concentration(%)	Ascorbic acid-2-phosphate(g/l)
None		13.05
SDS	0.05	13.63
	0.1	13.42
Tween80	0.05	13.24
	0.1	13.27
CTAB	0.05	13.07
	0.1	13.17
Triton X-100	0.05	13.44
	0.1	13.98
	0.15	13.88
	0.2	13.81

Reactions were carried out for 24hrs at 30°C in reaction mixture containing 100 g/l(wet weight) of cell concentration, 400 mM of ascorbic acid, 400 mM of disodium pyrophosphate and 50 mM of sodium acetate buffer(pH 4.5)

* SDS : Sodium dodecyl sulfate

CTAB : Cetyltrimethyl ammonium bromide

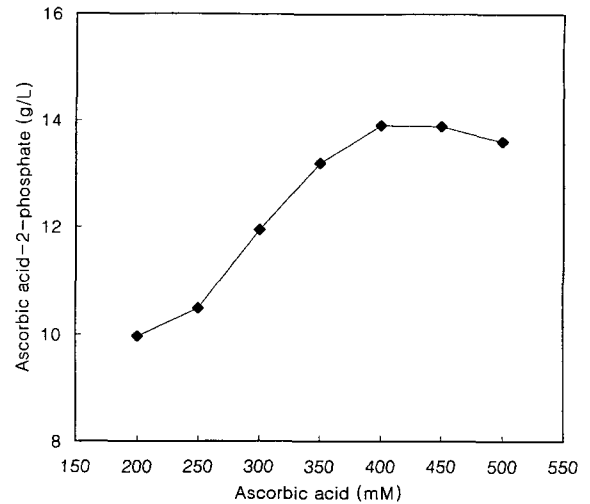
로 Triton X-100을 선택하여 그 최적농도에 대하여 검토하였다. Triton X-100의 첨가 농도를 0.05%에서 0.20%까지 변화시키면서 AsA2P의 생성량을 비교한 결과 Table 2에서 보듯이 0.1% 첨가했을 때 13.98 g/l 생산되었으며, 이는 대조구보다 약 7.1% 증가한 결과였다. 따라서 이후의 실험에서는 반응액에 0.1% Triton X-100을 첨가하여 수행하였다

Ascorbic acid-2-phosphate 생산에 미치는 ascorbic acid 농도 및 pyrophosphate 농도의 영향

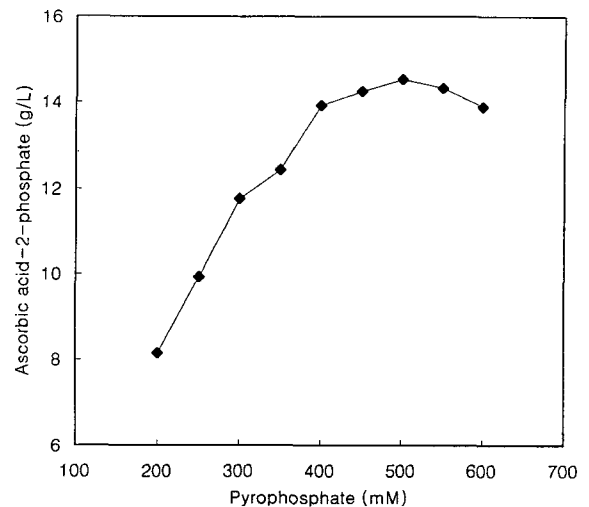
본 실험에서는 disodium pyrophosphate 농도를 400 mM로 고정하고 AsA2P 생산의 기질로 이용되는 ascorbic acid 농도를 200 mM로부터 500 mM까지 변화시키면서 농도의 변화가 AsA2P생산에 미치는 영향을 관찰하여 보았다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 400 mM까지 ascorbic acid의 농도가 증가할수록 AsA2P의 생산량은 13.91 g/l까지 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 따라서 ascorbic acid의 농도는 400 mM로 고정하여 사용하였다. Pyrophosphate 농도의 변화가 AsA2P 생산에 미치는 효과를 관찰하고자 하였다. 그 결과 Fig. 4에서와 같이 AsA2P의 생산량은 pyrophosphate의 농도가 500 mM일 때 14.54 g/l로서 가장 좋았다.

Ascorbic acid-2-phosphate 생산에 미치는 완충용액 및 온도의 영향

Ascorbic acid로부터 AsA2P로의 전환시 반응액에 사용되는 서로 다른 완충용액에 따른 영향을 조사하기 위하여

**Fig. 3. Effect of ascorbic acid concentration on ascorbic acid-2-phosphate production with resting cell.**

Reactions were carried out for 24hrs at 30°C in reaction mixture containing 100 g/l(wet weight) of cell concentration, 400 mM of pyrophosphate, 0.1%(v/v) of Triton X-100 and 50 mM of sodium acetate buffer(pH 4.5)

**Fig. 4. Effect of pyrophosphate concentration on ascorbic acid-2-phosphate production with resting cell.**

Reactions were carried out for 24hrs at 30°C in reaction mixture containing 100 g/l(wet weight) of cell concentration, 400 mM of ascorbic acid, 0.1%(v/v) of Triton X-100 and 50 mM of sodium acetate buffer(pH 4.5).

산성 조건에서 사용되는 4가지 완충용액을 사용하여 반응을 수행하였다. 그 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 AsA2P 생산에는 sodium acetate 완충용액이 가장 우수하였으며 pH 4.5의 50mM sodium acetate를 사용하였을 때 14.54 g/l로 가장 많은 생산량을 보였다.

또한 AsA2P 생산시 반응 온도가 미치는 영향을 조사하

Table 3. Effect of different buffers on ascorbic acid-2-phosphate production

Buffer(pH 4.5)	Ascorbic acid-2-sulfate(g/l)
Sodium acetate	14.62
Sodium formate	14.10
Sodium citrate	13.71
Sodium succinate	13.48

Reactions were carried out for 24hrs at 30°C in reaction mixture (pH4.5) containing 100 g/l(wet weight) of cell concentration, 400 mM of ascorbic acid, 500 mM of pyrophosphate, 0.1%(v/v) of Triton X-100 and 50 mM of various buffers.

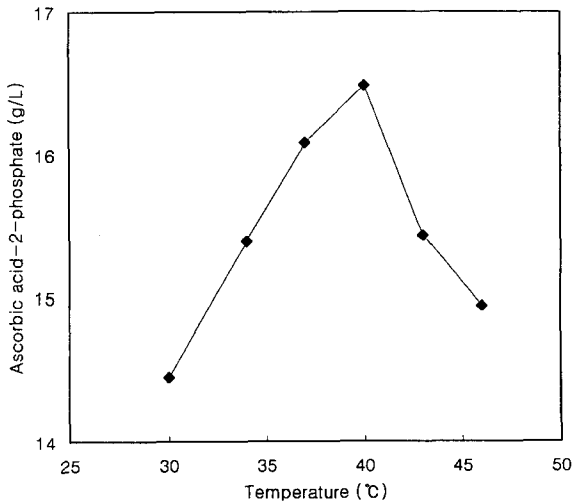


Fig. 5. Effect of temperature on ascorbic acid-2-phosphate production with resting cell.

Reactions were carried out for 24hrs in reaction mixture containing 100 g/l(wet weight) of cell concentration, 400 mM of ascorbic acid, 500 mM of pyrophosphate, 0.1% of Triton X-100 and 50 mM of sodium acetate buffer(pH 4.5)

기 위하여 30, 34, 37, 40, 43, 46°C에서 각각 반응시켰다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 AsA2P 생산량은 반응온도가 증가할수록 증가하였으며 40°C일 때 가장 좋았고 이 때 AsA2P 생산량은 400 mM의 ascorbic acid와 500 mM의 disodium pyrophosphate로부터 24시간 후에 16.48 g/l 가 생성되었다.

Ascorbic acid-2-phosphate 생산의 경시적 변화

이상의 결과로부터 얻어진 최적 조건하에서 *Pseudomonas* sp. LSH-3의 휴지세포에 의한 ascorbic acid와 disodium pyrophosphate로부터 AsA2P의 생산의 경시적 변화의 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 32시간까지는 AsA2P생산이 계속적으로 증가하나 그 이후에는 더 이상 증가하지 않았다. 32시간까지의 AsA2P는 17.71 g/l(69.98 mM)였으며, 전환율은 ascorbic

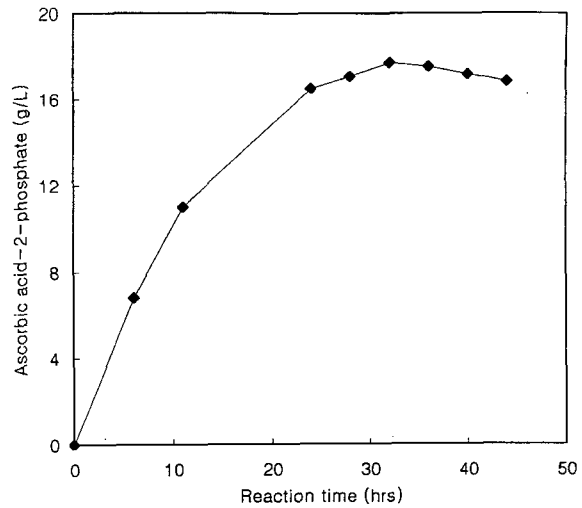


Fig. 6. Time course of ascorbic acid-2-phosphate production with resting cell.

Reaction was carried out at 40°C in reaction mixture containing 100 g/l (wet weight) of cell concentration, 400 mM of ascorbic acid, 500 mM of pyrophosphate, 0.1% of Triton X-100 and 50 mM of sodium acetate buffer(pH 4.5)

acid(400 mM)에 대한 이론적 mole 비로 17.5%에 해당하는 결과였다. 이러한 결과는 Fugio 등[5]이 야생균주의 휴지세포를 이용하여 생산한 AsA2P 8.84 g/l보다 많은 양을 생산하였으며 전환율은 같았다.

요 약

Ascorbic acid와 인산기 공여체로부터 ascorbic acid-2-phosphate를 생산하기 위하여 ascorbic acid를 ascorbic acid-2-phosphate로 전환할 수 있는 세균을 토양과 분 실험실 보관 균주로부터 분리하였다. 이들 중 ascorbic acid-2-phosphate 생산능이 가장 좋은 균주 LSH-3를 선별하였으며 *Pseudomonas* sp.로 부분 동정하였다.

Pseudomonas sp. LSH-3의 휴지세포를 효소원으로 사용하여 ascorbic acid와 인산기 공여체로부터 ascorbic acid-2-phosphate를 생산하는 최적 반응조건을 검토하였다. 상기의 결과들을 요약하면 다음과 같다. Ascorbic acid-2-phosphate를 생산하기위한 최적 배양시간과 균체농도는 14 시간, 100 g/l(wet weight)이었으며 0.1%(v/v) Triton X-100이 가장 효과적인 유화제이었다. Ascorbic acid와 pyrophosphate의 최적 농도는 각각 400 mM과 500 mM이었으며 이때 14.54 g/l의 ascorbic acid-2-phosphate가 생산되었다. 가장 효과적인 완충용액은 50 mM sodium acetate이었다. 최적 pH 및 온도는 각각 4.5와 40°C이었으며 위의 조건하에서 32시간 반응 후에 ascorbic acid로부터 17.71 g/l의 ascorbic acid-2-phosphate가 생산되었으며

전환율은 ascorbic acid에 대해 17.5%이었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처 선도기술과제(BNS81480-754-2)의 위탁연구로 수행되었으며, 연구비지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. API System S. A. 1986. Analytical Profile Index.
2. Bensinger, T. A., T. F. Zuck, B. Tolobert, 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.
3. El Naggar, G. O. and R. T. Lovell. 1991. L-Ascorbyl 2-Monophosphate has Equal Antiscorbutic Activity as L-Ascorbic Acid but A-Ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-Ascorbic Acid for Channel Catfish. *J. Nutr.* **121**: 1622-1626.
4. Friedrich, W. 1988. Vitamins. Walter De Gruyter & Co., Berlin.
5. Fugio, T., A. Maruyama, and S. Koizumi. 1989. Enzymic Preparation of Ascorbic Acid-2-Phosphate. *Eur. Pat. Appl.*, EP319130.
6. Helenius, A. and K. Simons. 1975. Solubilization of Membranes by Detergents. *Biochem. Biophysics. Acta.* **415**: 29-79.
7. Imai, Y., Y. Usui, T. Matsuzaki, H. Yokotani, H. Moma, and Y. Aramaki. 1967. The Antiscorbutic Activity of L-Ascorbic Acid Phosphate given orally and Percutaneously on Guinea Pigs. *Jap. J. Pharmacol.* **17**: 317-324.
8. Levine, M. and K. Morita. 1985. Ascorbic Acid in Endocrine Systems. *Vitamins and Hormones.* **42**: 2-64.
9. 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.
10. Mima, H., H. Nomura, Y. Imai, and H. Takashima. 1970. Chemistry and Application of Ascorbic Acid phosphate. *Vitamins(Japan).* **41**: 387-398.
11. Sapers, G. M., R. L. Miller, F. W. Douglas, and K. B. Hicks. 1991. Uptake and Fate of Ascorbic Acid-2-Phosphate in Infiltrated Fruit and Vegetable Tissue. *J. Food Sci.* **56**: 419-422.
12. Takamura, K. and M. Ito. 1977. Effects of Metal Ions and Flavonoids on the Oxidation of Ascorbic Acid. *Chem. Pharm.* **25**: 3218-3225.
13. Takashima, H., H. Nomura, Y. Imai, and H. Mima. 1971. Ascorbic Acid Esters and Skin Pigmentation. *Am. Perf. Cosmet.* **86**: 29-36.

(Received July 27, 1999)