

Candida rugosa 변이주를 이용한 D-β-Hydroxybutyric Acid 발효공정의 최적화

경수현 · 신철수*
연세대학교 공과대학 생명공학과

Optimization of D-β-hydroxybutyric Acid Fermentation Using a Mutant of *Candida Rugosa* IFO0750. Kyong, Su-Hyun and Chul Soo Shin*. Department of Biotechnology, College of Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea – A UV-mutant of *Candida rugosa* IFO0750 was made and used to convert butyric acid to D-β-hydroxybutyric acid(D-β-HBA). Major regulating factors for D-β-HBA fermentation were investigated via chemostat analyses. The maximum specific productivity was achieved at a specific growth rate of 0.06 h⁻¹ where the glucose and butyric acid concentrations in the fermentor were 10 g/L and 8.7 g/L, respectively. A fed-batch fermentation was performed with maintenance of the optimum glucose and butyric acid concentrations. The D-β-HBA concentration after 120 h of cultivation reached 12.4 g/L, which was 4.7 times greater than the concentration obtained by batch fermentation.

Key words: *Candida rugosa*, fermentation, D-β-hydroxybutyric acid

현재 국내외에 판매되고 있는 의약품의 50% 이상은 광학 활성을 지닌 키랄 화합물이며, 2000년 경에는 전체 의약품의 80% 이상을 차지할 것으로 예상되고 있다. 유기합성에 의하여 개발된 의약품은 두 가지 enantiomer로 되어 있는 racemic mixture로 주로 존재하며 이들 중 한 가지 enantiomer만 약효가 존재하는 경우가 많다[10]. 약리 효능이 없는 다른 enantiomer는 생체에 부작용을 일으키는 경우가 많아 미국의 FDA에서는 racemic mixture 대신 순수한 한 가지 enantiomer만을 생산하여 의약품에 이용하도록 권장하고 있으며, 제약회사에서도 이러한 방향으로 개발 연구를 진행하고 있다.

단일 효소나 미생물 효소를 이용하여 생물전환반응을 수행할 경우, 대부분의 생체 촉매는 입체 특이성에 의해 이들 중 한 가지 enantiomer만을 생산한다[1,5,11]. 미생물 종류나 반응 조건에 따라서 생성되는 enantiomer가 결정되므로 원하는 생성물을 얻기 위한 반응을 가능하게 하는 효소의 확보와 효소 반응 시스템에 대한 개발은 필수적이다.

의약품 중간체인 키랄 β-hydroxycarboxylic acid는 광학 활성 물질을 합성하기 위한 전구체로서 현재 산업적으로 널리 이용되고 있으며 수요는 급증할 것으로 기대되고 있다. 미생물을 이용하여 광학 활성이 있는 β-hydroxycarboxylic acid를 합성하는 방법이 보고되었다. Goodhue와 Schaeffer [2]는 *Pseudomonas putida*를 이용하여 isobutyric acid로부터

ter L-β-hydroxyisobutyric acid의 생산에 관하여, Hasegawa 등[3,4]은 isobutyric acid로부터 D-β-hydroxyisobutyric acid를 생산하는 *Candida rugosa*에 관하여 균주 개량을 시도하였으며 변이주를 이용하여 propionic acid로부터 β-hydroxy propionic acid를 생성함을 보고하였다. Kim[6]은 *Candida rugosa*와 *Yarrowia lipolytica*를 이용하여 isobutyric acid로부터 D-β-hydroxyisobutyric acid와 L-β-hydroxyisobutyric acid로의 전환을 각각 시도하였다. Shigeno 등 [9]은 여러 종류의 효모를 이용하여 1,3-butanediol으로부터 L-β-hydroxybutyric acid로의 전환에 대하여 보고하였다.

본 연구에서는 *Candida rugosa* IFO0750를 UV로 처리하여 변이주를 제조하고, 이를 이용하여 butyric acid로부터 hydroxylation 반응을 통해 D-β-hydroxybutyric acid 생산을 시도하였다. 또한, D-β-hydroxybutyric acid의 생산성을 증대시킬 목적으로 chemostat 배양을 통하여 발효의 주요 조절인자를 분석하였으며, 이와 같이 얻은 결과를 fed-batch 발효에 적용하여 D-β-hydroxybutyric acid의 생산성을 증대하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

Candida rugosa IFO0750와 이를 UV 처리하여 얻은 변이주 *Candida rugosa* CM42를 생물전환반응에 사용하였다.

배지 조성

종배양 배지로는 YM broth(Difco)를 사용하였다. Butyric

*Corresponding author

Tel. 82-2-2123-2886, Fax. 82-2-362-7265

E-mail: csshin@mail.yonsei.ac.kr

acid(이하 BA)로부터 D- β -hydroxybutyric acid(이하 D- β -HBA)로의 생물전환에 이용된 발효배지의 조성(g/L)은 glucose 4.0, yeast extract 0.3, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.3, KH_2PO_4 0.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08, NaCl 0.01, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.009, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 였으며, pH는 멸균 전에 7.0으로 조정하였다. 변이주 선별에 이용된 BA 배지는 glucose와 yeast extract 대신 biotin과 thiamin-HCl을 각각 1 mg과 2 mg 넣고 butyric acid를 10 mL를 첨가하여 준비하였다.

변이주 제조

Candida rugosa IFO0750의 변이주 제조는 *Yarrowia lipolytica* 변이주를 제조하는 방법[7]과 동일하게 수행하였다. 균체를 UV로 처리하여 얻은 현탁액으로부터 BA agar에서는 생육하지 않고 YM agar에서는 생육하는 후보 균주를 선별한 다음, 이들 중에 D- β -HBA 생산능이 가장 뛰어난 변이주를 최종 선별하였다.

균체 배양

종배양은 YM broth 10 mL를 넣은 100 mL Erlenmeyer flask를 121°C에서 15분간 가압살균 한 후, *Candida rugosa* CM42를 평판 배양한 plate로부터 백균이로 접종하여 회전식 진탕기(Vision Inc.)에서 30°C, 200 rpm의 조건으로 24 시간 진탕배양하였다.

생물전환을 위한 본배양은 발효배지 50 mL를 함유한 500 mL baffled flask에 종배양액을 5%(v/v)되게 접종하여 종배양과 동일한 조건으로 수행하였다. 발효조를 이용한 본배양은 실균한 배지를 1.5 L 함유한 3 L jar fermenter (KFC Co.)에 종배양액을 5%(v/v) 접종한 후, 교반속도 600 rpm, 공기공급속도 3 vvm, 30°C의 조건에서 수행하였다.

Fed-batch 배양은 3 L jar fermenter에서 본배양과 동일한 방법으로 진행하다가 접종 후 48 시간부터 glucose와 BA의 농도를 24 시간 간격으로 측정하여 부족분을 첨가함으로써 각각의 농도를 일정 수준으로 유지하면서 배양하였다.

Chemostat 배양

Chemostat 배양은 3 L jar fermenter에서 working volume 1.5 L, 공기공급속도 3 vvm, 교반속도 600 rpm, 30°C의 조건으로 수행하였다. 발효조에 inlet line을 설치하여 본배양 배지 reservoir로부터 peristaltic pump(Cole-Parmer Instrument Co.)를 이용하여 발효조에 일정 속도로 배지를 공급하고 outlet line을 설치하여 working volume을 1.5 L로 유지하였다. 희석율은 0.02~0.1 h⁻¹ 범위에서 조정하였다. 일정한 희석율에서 연속배양을 시작하여 residence time의 3 배가 경과한 후 일정한 간격으로 시료를 채취하여 균체 농도, 기질 농도 및 생성물 농도가 일정하게 유지될 때($\pm 5\%$)를 정상상태로 간주하여 결과를 얻었으며, 희석율을 변화시

켜 같은 과정을 반복하였다.

균체 농도 측정

배양액을 취한 후 적정 배수로 희석하고 spectrophotometer (Shimadzu UV-1201)를 이용해 660 nm에서 흡광도를 측정 한 후 표준 곡선에 대입하여 건조 균체 농도로 환산하였다.

기질 및 생성물의 분석

기질 및 생성물의 농도는 발효액 1 mL을 취해 원심분리 (Vision centrifuge VS-15000, angle type, 10,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 분석하여 측정하였다. BA, D- β -HBA, glucose의 정량은 HPLC를 이용하였다. HPLC column은 Aminex HPX-87H 300×7.8(Bio-rad), 영인 pump 910 및 R.I. detector(Waters 410)를 이용하였다. 이동상으로는 0.01N H₂SO₄ 용액을 상온에서 0.6 mL/min의 속도로 흘려주었다.

D- β -HBA의 확인을 위하여 배양액을 일정량 취한 후 원심분리(Hanil centrifuge Supra21K, angle type, 7,000 rpm, 15 min)하여 상등액을 취하고 H₂SO₄ 용액을 첨가하여 pH 2.0~2.5로 조정 한 후 3배 부피의 n-hexane을 첨가하여 추출하였다. 추출 후 아래 층을 취하여 3배 부피의 ethyl acetate를 첨가한 후, 위 층을 취하여 농축하였다. Column chromatography를 이용하여 농축액을 정제한 후 NMR spectra 분석을 통하여 생성물이 β -HBA인지 확인하였다. D-form의 β -HBA임을 확인하기 위해 polarimeter를 이용하였다.

시약

일반적인 시약은 Sigma, 덕산, Junsei, Difco 등의 특급 또는 시약급을 사용하였다.

결과 및 고찰

D- β -Hydroxybutyric acid 생산 변이주의 제조

Isobutyric acid로부터 D- β -hydroxy isobutyric acid(이하 D- β -HBA)로의 hydroxylation 반응은 *Candida rugosa* IFO 0750에 의하여 가능한 것으로 보고되었다[4,8]. 본 실험에서는 이와 동일한 균주를 확보하여 butyric acid(이하 BA)로부터 D- β -HBA로의 생물전환에 이용하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 BA는 대부분 소모되었으나 D- β -HBA는 전혀 존재하지 않았다. 이러한 결과를 통해 BA로부터 D- β -HBA가 생성된 후 분해된 것으로 유추할 수 있으며, D- β -HBA를 축적하기 위해서는 D- β -HBA 분해반응이 저지된 변이주를 이용하는 것이 필요할 것으로 생각되었다.

원 균주를 UV 처리한 후 유일한 탄소원으로 BA가 포함된 배지에서 생육할 수 없는 500개의 변이주를 1차적으로 선별하고, 이들 변이주에 의한 D- β -HBA의 생산성을 분

석하여 D-β-HBA 생산능이 가장 높은 변이주 3주를 선별하였다 (Table 1). 이 중 가장 높은 생산 수율을 나타내는 변이주 CM42를 최종 선택하였다.

¹H 및 ¹³C NMR spectra(400 MHz, D₂O)를 이용하여 *Candida rugosa* IFO0750의 변이주인 CM42가 생산하는 물질이 β-HBA임을 분석하였으며, polarimeter를 이용하여 D-form임을 확인하였다. Hasegawa등[3]의 보고에 의하면 변이주 CM42의 원 균주인 *Candida rugosa* IFO0750는 isobutyric acid로부터 D-form의 β-HBA를 생산하는 균주로 알려져 있다.

변이주의 회분식 발효 특성 분석

변이주 CM42를 이용한 회분식 배양에서 D-β-HBA 생산 시에 첨가되는 BA와 glucose의 최적 농도를 분석하였다. 기질로 사용되는 BA의 초기 농도를 1~4%(v/v) 범위로 각각 조정하여 flask에서 회분식 배양을 수행하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 최적 BA 농도는 2%(v/v)였으며 접종 후 24시간에 생성된 D-β-HBA 농도는 2.47 g/L이었다. BA 농도가 3%(v/v) 이상으로 증가할 경우 D-β-HBA의 생산량은 감소하였는데, 이는 BA에 의해 균체 생육이 심하게 저해받는 데 원인이 있는 것으로 사료되었다.

Butyric acid는 균체 생육의 에너지원으로 이용될 수 있기 때문에 D-β-HBA로의 효과적인 전환을 위해서는 glucose와 같이 에너지원으로 이용하기 쉬운 탄소원을 첨가하는 것이 필요하다고 판단되었다. 탄소원으로 glucose를 선

Table 1. Production of D-β-HBA by the mutants of *Candida rugosa* IFO0750

Strain	Residual butyric acid (g/L)	β-HBA (g/L)
Control	0.00	0.00
CM42	15.72	3.33
CM606	14.57	3.21
CM611	15.48	2.68

*Cultivations were carried out in a 500 mL baffled flask containing 50 mL of fermentation medium on a rotary shaker at 30°C and 200 rpm for 24 h.

β-HBA: β-hydroxybutyric acid

Table 2. D-β-HBA production by *Candida rugosa* CM42 at various initial butyric acid concentrations

Butyric acid conc. (initial %, v/v)	Concentration (g/L)			Dry cell weight (g/L)
	Glucose	Butyric acid	D-β-HBA	
1	2.45	8.51	1.23	25.36
2	3.58	16.38	2.47	20.42
3	3.87	28.08	1.14	17.70
4	13.46	35.35	1.00	8.87

*Cultivations were carried out in a 500 mL baffled flask containing 50 mL of fermentation medium on a rotary shaker for 24 h at 30°C.

* Initial glucose concentration was 40 g/L.

D-β-HBA : D-β-hydroxybutyric acid.

택하고 초기 농도를 2~7%(w/v)로 각각 변화시켜 flask에서 회분식 배양을 수행하였다. 24시간 배양한 후의 D-β-HBA 농도를 분석한 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 glucose의 초기 농도가 2%인 경우 D-β-HBA는 전혀 축적되지 않았으나 4%인 경우 가장 많은 양인 2.66 g/L가 얻어졌다. Glucose가 3% 이하로 첨가되었을 경우 배양 24시간 후에 glucose는 완전히 소모되었으며 BA의 일부는 에너지원으로 이용된 것으로 생각되었다.

BA와 glucose의 초기 농도를 최적 조건인 20 g/L, 40 g/L로 각각 조절하고 3 L jar fermenter에서 회분식 배양을 진행하여 growth-production 경향을 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 *Candida rugosa* CM42의 균체 농도는 대체로 48 시간까지 급격히 증가하였고 그 이후에는 일정하였다. Glucose는 20 시간이 경과하였을 때 모두 소비되었고, D-β-HBA는 8시간 이후에 생성되다가 glucose가 모두 소비된 20시간에 분해되기 시작하여 40 시간 이후부터 모두 분해되었다. BA는 28 시간까지는 서서히 소비되었으나 그 이후에는 급격히 분해되어 48 시간에는 완전히 소비되었다. D-β-HBA가 생성된 후 다시 분해되는 것은 본 실험에서 이용한 균주의 D-β-HBA 분해능이 완전히 소멸되지 않아, glucose가 완전히 소비된 후에도 여전히 D-β-HBA를 에너지원으로 사용한 것에 기인한 것으로 판단되었다.

Chemostat을 이용한 변이주의 발효 특성 분석

발효의 주요 조절인자를 분석하는 방법으로 chemostat가 자주 이용된다. Lee 등[8]은 methacrylic acid로부터 D-β-HBA로의 발효 조절인자를 탐색하기 위해 chemostat 분석을 수행하였으며, Kyong과 Shin[7]은 BA로부터 L-β-HBA로의 발효생산을 최적화 하는데 이용하였다.

본 실험에서도 D-β-HBA 발효의 주요 조절인자를 분석하기 위하여 chemostat를 이용하여 3 L 연속 발효조에서 배양을 수행하였다. 발효조에 공급되는 배지의 BA와 glucose의 초기 농도를 각각 20 g/L와 40 g/L로 조절하고, 기질의 공급속도인 희석율을 0.02~0.10 h⁻¹범위로 조정하여 정상상태에 도달하였을 때 각각의 농도를 측정하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 0.06 h⁻¹의 희석율로 배양한 경우 균체 활

Table 3. D-β-HBA production by *Candida rugosa* CM42 at various initial glucose concentrations

Glucose conc. (initial %, v/v)	Concentration (g/L)			Dry cell weight (g/L)
	Glucose	Butyric acid	D-β-HBA	
2	0.00	7.99	0.00	17.02
3	0.00	8.01	1.70	24.39
4	3.76	15.81	2.66	25.32
5	7.21	15.63	1.83	25.44
6	13.72	16.16	2.09	25.03
7	25.35	16.90	1.51	21.15

* Cultivations were carried out in a 500 mL baffled flask containing 50 mL of fermentation medium on a rotary shaker for 24 h at 30°C.

* Initial butyric acid concentration was 20 g/L.

D-β-HBA : D-β-hydroxybutyric acid.

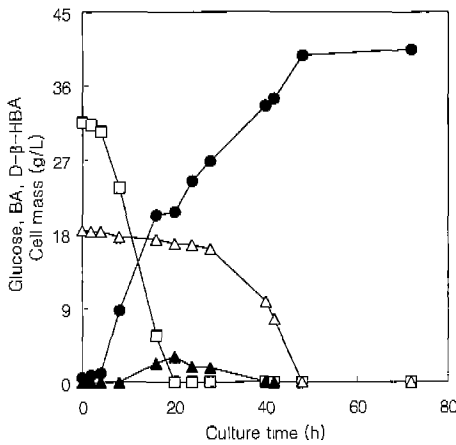


Fig. 1. Production of D-β-HBA by batch fermentation of *Candida rugosa* CM42 in a 3 L jar fermenter.

●: Cell mass; ▲: D-β-HBA(D-β-hydroxybutyric acid); □: glucose; △: BA(butyric acid)

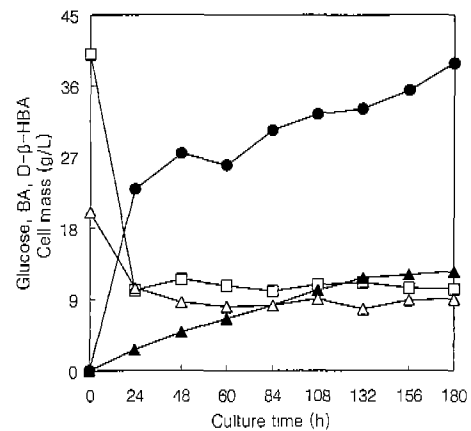


Fig. 2. Fed-batch fermentation of D-β-hydroxybutyric acid by *Candida rugosa* CM42 in a 3 L jar fermenter.

●: cell mass; ▲: D-β-HBA(D-β-hydroxybutyric acid); □: glucose; △: BA(butyric acid).

성을 나타내는 비생산성이 최대 0.0117 h⁻¹ 언어졌다. 이에 비하여 0.04 h⁻¹ 이하의 회색율에서는 상당히 낮은 값의 비생산성을 나타내었으며 특히 0.02 h⁻¹ 의 낮은 회색율에서는 대부분의 균체가 old cell로 존재할 것으로 사료되어 일정 수준 이상으로 균체 생육을 유지하는 것이 D-β-HBA의 생산에 유리할 것으로 판단되었다.

균체의 생육을 위해 배지내에 첨가되는 탄소원인 glucose의 농도를 발효중의 조절인자로서 가정하고, 3 L 연속 발효

조의 회색율을 0.06 h⁻¹, 공급되는 배지의 BA의 농도를 20 g/L로 고정하고 glucose 농도를 20~60 g/L 범위에서 각각 변화시켜 발효를 수행하였다. Table 5의 정상상태 결과에서 보는 바와 같이 공급되는 배지의 glucose 농도 변화에 따라 D-β-HBA 농도, 생산성 등이 변화하였다. D-β-HBA 생산성 및 비생산성의 최대치는 각각 0.324 g/L h, 0.02 h⁻¹ 이었으며, 이때 발효조 내의 glucose와 BA의 농도가 10.01 g/L, 8.70 g/L로 각각 나타났다.

Table 4. Steady state data of D-β-HBA fermentation by *Candida rugosa* CM42 at various dilution rates

Dilution rate (h ⁻¹)	Cell mass (g/L)	BA (g/L)	D-β-HBA (g/L)	Productivity (g/L·h)	q _P (g/g·h)	BA uptake rate (g/g·h)
0.02	20.78	1.41	1.26	0.025	0.0012	0.017
0.04	36.58	2.03	1.74	0.070	0.0019	0.019
0.06	25.68	4.81	4.98	0.300	0.0117	0.035
0.08	15.48	11.66	2.18	0.174	0.0112	0.069
0.10	8.66	15.49	0.87	0.087	0.0100	0.098

BA : butyric acid.

D-β-HBA: D-β-hydroxybutyric acid.

q_P : specific productivity

Table 5. Steady state data of D-β-HBA fermentation by *Candida rugosa* CM42 at various feeding glucose concentrations

Feeding glucose (g/L)	Cell mass (g/L)	Glucose (g/L)	BA (g/L)	D-β-HBA (g/L)	Productivity (g/L h)	q _p (g/g·h)	Specific glucose uptake rate (g/g·h)	Specific BA uptake rate (g/g·h)
20	21.84	0.00	2.12	0.00	0.000	0.000	0.055	0.049
30	22.04	0.00	3.75	0.00	0.000	0.000	0.082	0.044
40	20.44	0.00	4.50	4.79	0.287	0.014	0.117	0.045
50	16.32	10.01	8.70	5.40	0.324	0.020	0.147	0.041
60	14.60	15.08	14.57	1.04	0.062	0.004	0.184	0.022

BA : butyric acid.

D-β-HBA: D-β-hydroxybutyric acid.

q_p specific productivity

최적 조건에서의 fed-batch 발효

앞서 수행한 chemostat 배양에서 분석된 최적 조건 결과에 근거하여 균체 활성을 최대 유지하기 위한 glucose와 BA의 농도를 발효의 조절인자로 설정하여 fed-batch 발효를 수행하였다. 균체의 최대 활성을 보인 조건인 발효조 내 glucose와 BA의 농도를 10 g/L와 8.7 g/L로 각각 유지하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 발효 개시 180 시간이 경과한 후에 12.4 g/L의 D-β-HBA가 얻어졌으며, 이는 앞서 수행한 회분식 발효에 비하여 4.7배 높은 값이다. Lee 등 [8]은 D-β-HBA 생산성을 향상시키기 위해 기질인 methacrylic acid의 첨가 방법을 최적화하는 fed-batch 배양을 수행하였으나 본 연구에서는 기질인 BA와 아울러 에너지 원인 glucose를 첨가하여 발효조 내의 이들 농도를 일정하게 유지하는 fed-batch 배양이 효과적이었다.

결론적으로, BA를 탄소원으로 이용할 수 있는 *Candida rugosa* IFO0750의 변이주를 이용하여 BA로부터 D-β-HBA의 생산이 가능하였으며, 발효 조절 인자인 BA와 glucose의 농도를 일정하게 유지하며 fed-batch 발효를 수행함으로써 균체의 활성을 높게 유지하여 궁극적으로 D-β-HBA 생산을 극대화할 수 있었다.

요 약

Candida rugosa IFO0750의 UV-변이주를 제조하여 butyric acid를 D-β-hydroxybutyric acid (이하 D-β-HBA)로 전환하는 데 이용하였다. 후보 변이주 중 활성이 가장 높은 *Candida rugosa* CM42를 이용하여 발효를 수행한 후 NMR 분석, polarimeter 분석 등을 통하여 생성된 물질이 D-β-HBA임을 확인하였다. Chemostat 배양을 이용하여 D-β-HBA 발효 생산의 주요 영향인자를 분석하였으며, 균체의 활성을 나타내는 D-β-HBA 비생산성의 최대치는 균체의 비증식 속도를 0.06 h⁻¹, 발효조 내의 glucose와 butyric acid의 농도를 각각 10 g/L와 8.7 g/L로 각각 유지할 때 얻어졌다. 회분식 배양 중에 glucose와 butyric acid를 공급하여 발효조 내의 glucose 및 butyric acid 농도를 최적

조건으로 유지하는 fed-batch 발효를 수행하였다. 배양 180 시간 후에 D-β-HBA 농도가 약 12.4 g/L에 도달하였으며 회분식 발효에 비하여 4.7배 증가하였다.

감사의 글

이 연구는 한국학술진흥재단 연구비(1997)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Faber, K. and M. C. R. Franssen. 1993. Prospects for the increased application of biocatalysis inorganic transformations. *Trends Biotechnol.* **11**: 461-470.
2. Goodhue, C. T. and J. R. Schaeffer. 1971. Preparation of L-hydroxyisobutyric acid by bacterial oxidation of isobutyric acid. *Biotechnol. Bioeng.* **13**: 203-214.
3. Hasegawa, J., M. Ogura, H. Kanema, H. Kawaharada and K. Watanabe. 1981. Stereoselective conversion of isobutyric acid to β-hydroxyisobutyric acid by microorganism. *J. Ferment. Technol.* **59**: 203-208.
4. Hasegawa, J., M. Ogura, H. Kanema, H. Kawaharada and K. Watanabe. 1982. Production of β-propionic acid from propionic acid by a *Candida rugosa* mutant unable to assimilate propionic acid. *J. Ferment. Technol.* **60**: 591-594.
5. Jones, J. B. 1986. Enzymes in organic synthesis. *Tetrahedron* **42**: 3351-3403.
6. Kim, H. S. 1997. Stereoselective bioconversion of isobutyric acid to D- and L-β-hydroxyisobutyric acids by yeasts. MS thesis, Yonsei University, Seoul, Korea.
7. Kyong, S. H. and C. S. Shin. 2000. Optimized production of L-β-hydroxybutyric acid by a mutant of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* **22**: 1105-1110.
8. Lee, I. Y., C. H. Kim, B. K. Yeon, W. K. Hong, E. S. Choi, S. K. Rhee, Y. H. Park and D. H. Sung and W. H. Baek. 1997. High production of D-β-hydroxyisobutyric acid from methacrylic acid by *Candida rugosa* and its mutant. *Bioprocess Eng.* **16**: 247-252.
9. Shigeno, T., A. Katayama, and T. Nakahara. 1992. Produc-

- tion of (S)-(+)-3-hydroxybutyric acid from 1,3-butanediol by resting cells of yeasts. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 320–323.
10. Sih, C. J., G. M. Gu, G. Fulling, S. H. Wu and D. R. Reddy. 1988. The use of microbial enzymes for the synthesis of optically active pharmaceutical. *J. Ind. Microbiol.* **29**: 221–229.
11. Werf, M. J., W. I. I. Tweel, J. Kamphuis, S. Hartmans and J. A. M. Bont. 1994. The potential of lyases for the industrial production of optically active compounds. *Trends Biotechnol.* **12**: 95–103.

(Received November 4, 2000)