

## Bacillus sp. YH-001에 의한 DL-Phenylglycine으로부터 Benzoylformic acid의 생산

박윤희 · 이일석 · 방원기\*  
고려대학교 자연자원대학 농화학과

**Production of Benzoylformic Acid from DL-Phenylglycine by *Bacillus* sp. YH-001.** Yun-Hee Park, Il-Seok Lee and Won-Gi Bang. Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea - For the production of benzoylformic acid from DL-phenylglycine, 8 strains of bacteria capable of producing benzoylformic acid were isolated from soil. Among them, the strain YH-001 showed the highest activity for production of benzoylformic acid, and was partially identified as a *Bacillus* sp. For the production of benzoylformic acid, a reaction mixture and reaction conditions were optimized as follows: the reaction mixture contained 2 g of DL-phenylglycine and 50 g of wet cells in 1 l of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0) and the reaction was carried out at 40°C with shaking. After 6 hr incubation, 1.01 g/l of benzoylformic acid was produced which corresponded to a conversion yield of 50.5%.

Benzoylformic acid는 의약품의 제조원료로서 특히 penicillin과 cephalosporin계 항생물질의 축쇄 수식체로 사용되며, 또한 기관지염 치료제, 교감신경 자극제, 충혈 치료제 및 동공확대제로서 사용되는 ephedrine의 합성 중간체, 항비만제의 합성중간체 및 액정 화합물의 원료인 R-(-)-mandelic acid를 생산하는데 중요한 전구물질이다(1-4). 또한, benzoylformic acid는 제초제로 쓰이는 L-phosphinothricin의 전구물질로도 사용된다(5). 한편, benzoylformic acid의 유도체인 p-hydroxybenzoylformic acid는 항진균작용(antifungal activity)을 나타내는 것으로 보고되어 있다(6).

미생물에 의한 benzoylformic acid 생산에 관한 연구는 Kanzaki 등(7)에 의해 효모인 *Saccharomycopsis lipolytica*를 이용하여 DL-phenylglycine으로부터 benzoylformic acid의 생산을 시도한 것 외에는 거의 연구가 되어있지 않은 실정이다.

본 실험에서는 DL-phenylglycine으로부터 benzoylformic acid를 생산하기 위해 benzoylformic acid 생산능이 있는 미생물들을 토양으로부터 분리한 후, benzoylformic acid 생산능이 가장 뛰어난 균주를 선별하였다. 그리고 선별된 균주의 휴지세포를 직접 효소원으로 이용하여 benzoylformic acid 생산을 위한 최적반응조건을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주

\*Corresponding author  
Tel. 82-2-3290-3022, Fax. 82-2-923-8183  
E-mail: agrchem@kucncx.korea.ac.kr  
Key words: Benzoylformic acid, DL-Phenylglycine, *Bacillus* sp.

본 실험에서는 하천토양으로부터 benzoylformic acid 생산균주 *Bacillus* sp. YH-001을 분리 선별하여 사용하였다.

#### 균주의 분리 및 benzoylformic acid 생산균주의 선별

DL-Phenylglycine으로부터 benzoylformic acid를 생성할 수 있는 균주를 분리하기 위하여, DL-phenylglycine 2.0 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.0 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.0 g/l를 함유하는 분리배지(pH 7.0)를 사용하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.

채취한 토양을 멸균된 0.9% 생리 식염수에 잘 현탁시킨 후, 여과지를 사용하여 거르고 여과액을 분리배지에 1%(v/v)가 되도록 접종한 다음, 30°C에서 24시간 진탕 배양(200 rpm)하였다. 이 과정을 3번 반복한 후, 배양액의 균체수를  $10^2$ - $10^4$  cells/ml이 되도록 생리 식염수에서 희석하였다. 희석액을 분리배지의 한천 평판 배지에 0.2 ml씩 도말한 후, 30°C에서 48시간 배양하여 생육된 균락을 백금이를 이용하여 순수분리 하였다.

상기의 순수분리한 균주들을 분리배지가 10 ml씩 함유된 25 ml 시험관에 한 백금이 씩 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양한 균체를 수확한 후, 0.2% DL-phenylglycine이 함유된 반응액을 첨가하여 30°C에서 12시간 반응시킨 다음, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 반응액내의 benzoylformic acid의 생성 유무를 조사하기 위하여 상기 상등액을 thin layer chromatography plate상에 점적하고 전개시킨 다음, UV상에서 benzoylformic acid의 뚜렷한 spot을 보이는 균주들을 선별하였다. 선별된 균주들을 분리배지가 각각 10 ml씩 함유된 25 ml 시험관에 한 백금이 접종하고 30°C에서 24시간 진탕배양(200 rpm)한 다음, 100 ml의 분리배

지를 함유한 각각의 500 ml Erlenmeyer flask에 1 ml씩을 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양(200 rpm)하였다. 각각의 상기 배양액을 4°C에서 30분 동안 원심분리(4000×g)하여 수확한 후, 동일한 양의 균체를 각각 2.0 g/l의 DL-phenylglycine이 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2) 반응액에 첨가하여 12시간 반응시켰다. 반응액을 4°C에서 20분간 원심분리하고 상등액을 high performance liquid chromatography로 분석하여 benzoylformic acid 생성능이 가장 좋은 균주를 선별하였다.

### 선별 균주의 배양 및 반응조건

선별된 균주를 2.0% 한천이 포함된 LB배지에 한 백금이 접종하여 30°C에서 24시간 평판배양한 후, 한 균락으로부터 LB 배지를 10 ml 함유하고 있는 50 ml Erlenmeyer flask에 한 백금이 접종하여 30°C에서 진탕배양(200 rpm)하여 전배양액으로 하였다. LB 배지 100 ml을 함유하는 500 ml Erlenmeyer flask에 전배양액 1 ml을 접종하고, 30°C에서 15시간 진탕배양(200 rpm)하여 균체수확을 위한 본배양액으로 사용하였다. 이렇게 배양된 균체를 4°C에서 30분간 원심분리(4000×g)하고, 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)로 2회 세척한 후, 효소원으로 사용하였다.

상기 수확된 균체와 2.0 g/l의 DL-phenylglycine이 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2) 반응액을 사용하여 benzoylformic acid 생산능 및 최적 반응조건을 검토하였다.

### 정성 및 정량분석

Benzoylformic acid의 정성분석은 Yamazaki와 Maeda (1)의 thin layer chromatography 법을 사용하였으며, 정량분석은 Kanzaki 등(7)의 방법에 따라 high performance liquid chromatography법에 의하여 수행하였다. 분석용 시료로는 상기 반응액을 원심분리하여 얻은 상등액을 회석하여 0.45 µm membrane filter를 사용하여 여과한 후, 여과액 10 µl를 취하여 시료로 사용하였다. 시료의 분석을 위하여 µ-Bondapack C<sub>18</sub>(300 mm×2 mm) column을 사용하였으며, 분석 조건으로서 유속은 0.5 ml/min, 이동상은 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) : methanol=9:1(v/v)이었으며, 시료의 검출은 UV detector를 사용하여 212 nm에서 수행하였다.

균체량의 측정에는 spectrophotometer(Novaspec II)를 사용하여 600 nm에서 배양액의 탁도(optical density)를 측정함으로써 행하였다.

### Benzoylformic acid producing activity의 unit 정의

Benzoylformic acid producing activity의 1 unit는

1시간당 DL-phenylglycine으로부터 1 µmole의 benzoylformic acid를 생성하는데 요구되는 균체량으로 정의하였다.

### 균주의 동정

분리 및 선별된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(8)에 따라 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### Benzoylformic acid 생성 균주의 분리 및 선별

DL-Phenylglycine으로부터 benzoylformic acid를 생성하는 균주를 분리하기 위하여 DL-phenylglycine을 함유하는 분리배지를 사용하여 재료 및 방법에 따라 80여종의 균주를 토양으로부터 순수분리하였다. 이들 균주들을 분리배지에 한 백금이 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 수확한 다음 0.2% DL-phenylglycine을 함유하는 반응액으로 반응을 수행하였다. 이들중 thin layer chromatography상에서 뚜렷한 spot을 보이는 8종을 선별하여 각각 YH-001, YH-008, YH-017, YH-021, YH-033, YH-047, YH-072, YH-079로 명명하였다. 선별된 8종의 균주를 분리배지에 각각 접종한 후, 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양후 균체를 수확하여 균주선별을 위한 반응액으로 반응을 수행하였다.

Table 1은 상기의 실험결과로서 8종의 균주의 생육속도 및 12시간 반응시켰을 때의 비활성을 나타내고 있다. Table 1에 나타난 바와같이, 균주의 생육은 YH-008의 경우가 다른 균주에 비해 월등히 좋았고 그 이외의 균주들은 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나, YH-008의 경우에 생육은 좋았지만 비활성은 낮았으며, YH-001의 경우에 다른 균주에 비해 생육정도는 비슷했지만 비활성이 가장 좋았기 때문에, 본 실험의 균주로서 선발하여 이후의 실험에 사용하였다.

**Table 1. Comparison of growth and specific activity of isolated microorganisms**

Strains	Growth	Specific activity
YH-001	0.211	16.79
YH-008	0.438	4.66
YH-017	0.287	3.44
YH-021	0.253	11.46
YH-033	0.221	10.24
YH-047	0.234	10.71
YH-072	0.219	15.4
YH-079	0.260	11.16

\*Reaction was carried out 12 hr at 30°C in the reaction mixture containing 20 g/l (wet weight) of cell concentration, 0.2% of DL-phenylglycine and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2). Specific activity: (µM/hr/g cell).

**Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain YH-001**

Assimilation of carbon compounds:					
D-glucose	+	L-arabinose	+	D-gluconate	+
D-mannose	+	D-ribose	+	DL-lactate	+
D-fructose	+	L-sorbose	-	D-glucuronate	-
maltose	+	D-melizitose	-	citrate	-
lactose	+	D-xylose	+	succinate	+
sucrose	+	mannitol	-	acetate	-
D-cellobiose	+	dulcitol	-	malate	+
L-rhamnose	+	inositol	+	N-acetyl-	
raffinose	+	glycerol	+	glucosamine	+
mellibiose	+	adonitol	-		

Motility : +  
 Gram test : +  
 Shape : rod  
 Oxidase : +  
 Catalase : +  
 Oxygen requirement : facultative anaerobe  
 O/F test : fermentative  
 Reduction of nitrates to nitrites : -  
 Methyl red test : -  
 Strach hydrolysis : -  
 Gelation hydrolysis : -  
 Indole production : -  
 Glucose acidification : +  
 Urease : -  
 Arginine dihydrolase : -  
 $\beta$ -Galactosidase : +

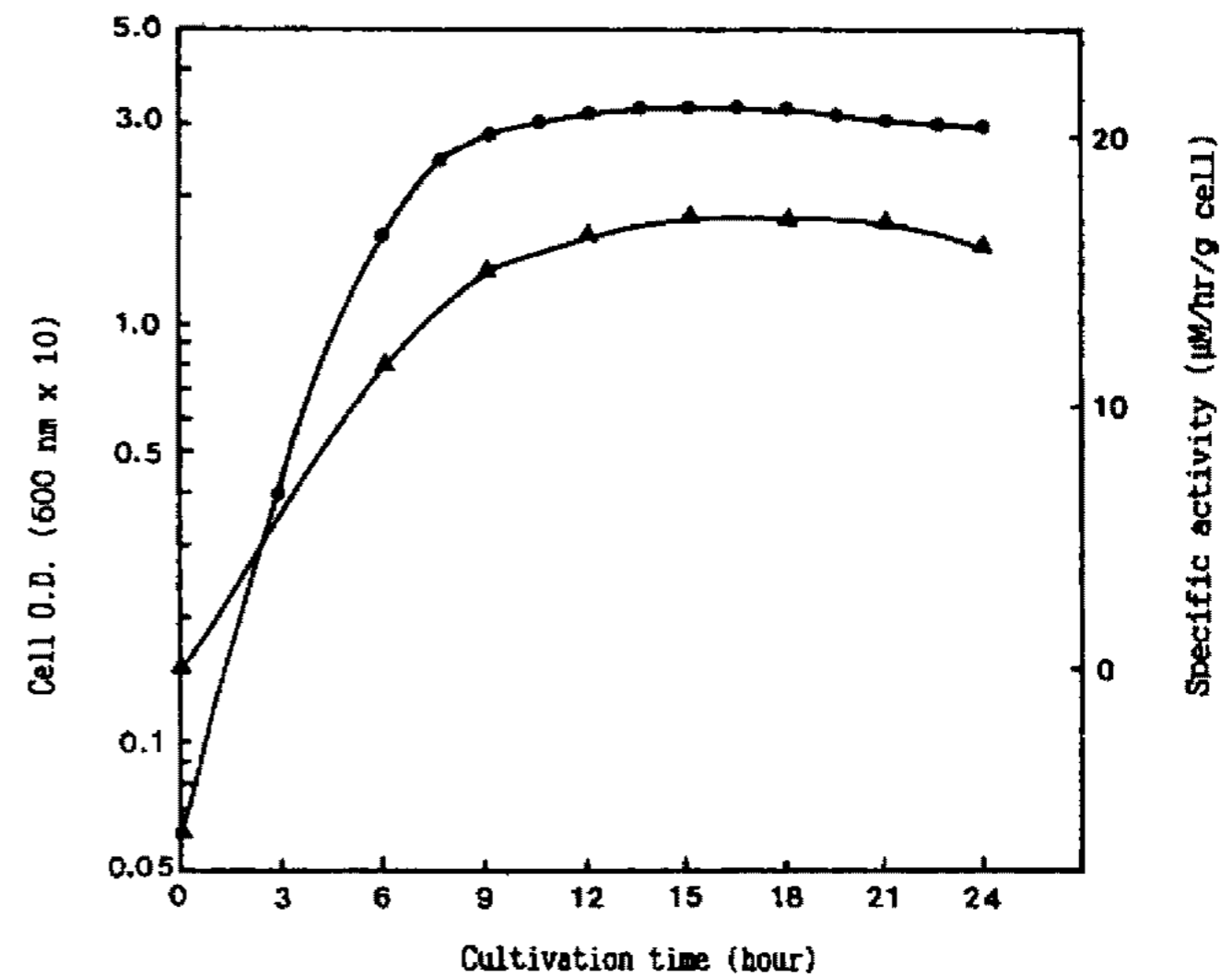
Symbols: +, positive; -, negative.

### 분리균주의 동정

순수분리한 YH-001은 Gram 양성의 간균으로 관찰되었으며 그 생리적, 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 2와 같았다. 이 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (8)에 의하여 *Bacillus* sp.로 부분 동정하였다.

### 증식세포의 benzoylformic acid producing activity의 경시적 변화

Benzoylformic acid 생산능이 최대인 균체를 수확하기 위하여 시간의 경과에 따른 균체량과 상기의 반응조건하에서 benzoylformic acid 생산능의 변화를 비교하였다. Fig. 1에서 볼 수 있는 바와같이 대수증식말기인 배양시간이 9시간에 이르기까지는 균체의 생육이 꾸준히 증가하였으며, 그 이후에는 더이상의 증가를 보이지 않았고 비활성은 반응초기로부터 12시간에 이르기까지는 증가하였지만, 12시간 이후에는 거의 비슷한 경향을 보였으며 15시간에 최대값을 나타내었다. 따라서, 이후의 실험에서는 15시간 배양한 균체를 수확하여 DL-phenylglycine으로부터 benzoylformic acid 생산을 위한 효소원으로 사용하였다.

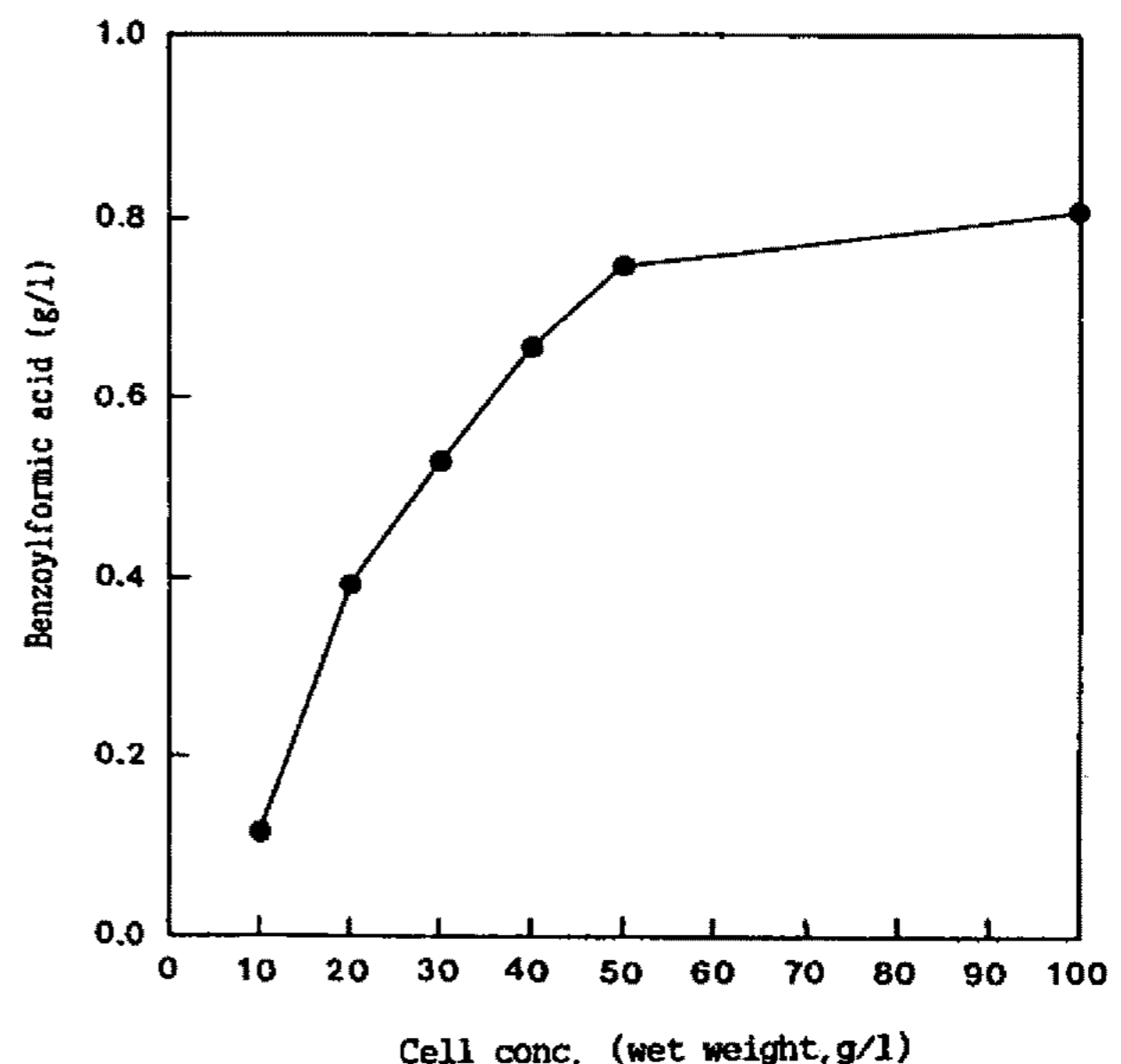


**Fig. 1. Growth curve of YH-001 and change in benzoylformic acid producing activity.**

Cultivation was carried out at 30°C in LB medium. Reaction was carried out for 12 hr at 30°C in reaction mixture containing 20 g/l (wet weight) of cell concentration, 0.2% of DL-phenylglycine and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2). Specific activity: (µM/hr/g cell). Cell O.D.: ●—●, Specific activity: ▲—▲

### 휴지세포를 이용한 DL-phenylglycine으로부터 benzoylformic acid의 생산

Benzoylformic acid 생산에 미치는 균체량의 영향 효소원으로 사용되는 균체량이 변화함에 따라 기질인 DL-phenylglycine으로부터 생산되는 benzoylformic acid의 양이 영향을 받을 것으로 생각되어, 균체량과 benzoylformic acid의 생산량과의 관계를 검토하였다. Fig. 2에



**Fig. 2. Effect of cell concentration on the benzoylformic acid production with resting cells.**

Reaction was carried out for 6 hr at 30°C in the reaction mixture containing 0.2% of DL-phenylglycine and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2).

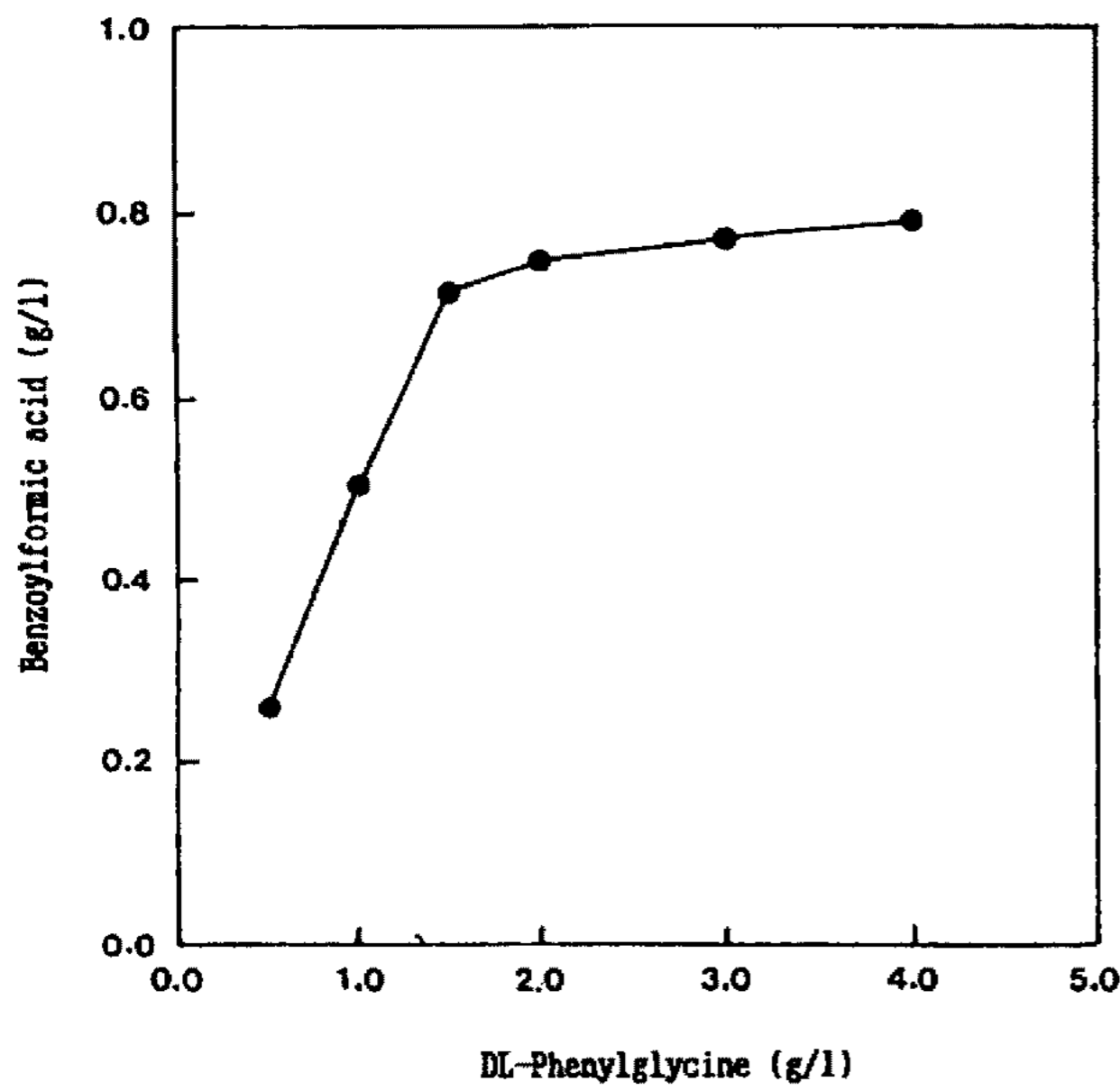


Fig. 3. Effect of DL-phenylglycine concentration on the benzoylformic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 6 hr at 30°C in the reaction mixture containing 50 g/l (wet weight) of cell concentration and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2).

서 볼 수 있는 바와같이, 균체량이 증가함에 따라 benzoylformic acid의 생산량도 증가함을 알 수 있었고, 생균체량이 50 g/l에 이르기까지는 benzoylformic acid 생산량도 비례적으로 증가하는 경향을 보였으며, 이때의 benzoylformic acid 생산량은 0.75 g/l이었다. 그러나, 그 이상의 균체량에서는 benzoylformic acid 생산량이 크게 증가하지 않음을 알 수 있었다. 따라서, 이후의 실험에서는 50 g/l의 균체량을 사용하였다.

**Benzoylformic acid 생산에 미치는 DL-phenylglycine 농도의 영향** 휴지세포에 의한 benzoylformic acid 생산시 DL-phenylglycine의 농도가 benzoylformic acid 생산에 미치는 영향을 검토한 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 DL-phenylglycine의 농도가 1.5 g/l에 이르기까지는 benzoylformic acid 생산량이 급격히 증가하였고, 2 g/l까지는 계속 증가하였으며 이때의 benzoylformic acid 생산량은 0.75 g/l이었다. 그러나, 그 이상의 DL-phenylglycine 농도에서는 benzoylformic acid 생산량의 증가가 둔화되었다. 따라서 이후의 실험에서는 2 g/l의 DL-phenylglycine을 사용하였다.

**Benzoylformic acid 생산에 미치는 각종 완충용액의 영향** 휴지세포에 의한 benzoylformic acid 생산시 buffer의 종류에 따른 benzoylformic acid 생산에 미치는 영향을 검토한 결과, Table 3에서 보는 바와같이 potassium phosphate buffer의 경우에 benzoylformic acid의 생산량이 가장 많았으며, 따라서 이후의 실험에서 potassium phosphate buffer를 사용하였다.

**Benzoylformic acid 생산에 미치는 완충용액 농도의**

Table 3. Effect of different buffers on benzoylformic acid production with resting cells

Buffers (pH 7.2)	Benzoylformic acid (g/l)
Potassium phosphate	0.749
Sodium phosphate	0.743
Imidazole-Cl	0.174
Tris-Cl	0.681

\*Reaction was carried out for 6 hr at 30°C in reaction mixture containing 50 g/l (wet weight) of cell concentration, 0.2% of DL-phenylglycine.

**영향** 휴지세포에 의한 benzoylformic acid 생산시 buffer의 농도가 benzoylformic acid 생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 buffer의 농도를 25 mM에서 200 mM까지 변화시켜 실험을 수행하였다. Fig. 4에서 보는 바와같이, potassium phosphate buffer의 농도가 50 mM에 이르기까지는 benzoylformic acid의 생산량이 증가하였고, 농도가 50 mM 일때 benzoylformic acid의 생산량이 0.75 g/l로서 최대가 되었으며, 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보였다. 따라서 이후의 실험에서는 50 mM의 potassium phosphate buffer를 사용하였다.

**Benzoylformic acid 생산에 미치는 완충용액의 pH 영향** 휴지세포에 의한 benzoylformic acid 생산에 미치는 buffer pH의 영향을 조사하기 위하여, 반응액의 초기 pH를 5.6에서 8.8까지 변화시키면서 benzoylformic acid의 생산량을 검토하였다. Fig. 5에 나타난 바와같이 pH 8.0에 이르기까지는 pH가 높아짐에 따라 benzoylformic acid의 생산량이 꾸준히 증가하였고, pH 8.0에서

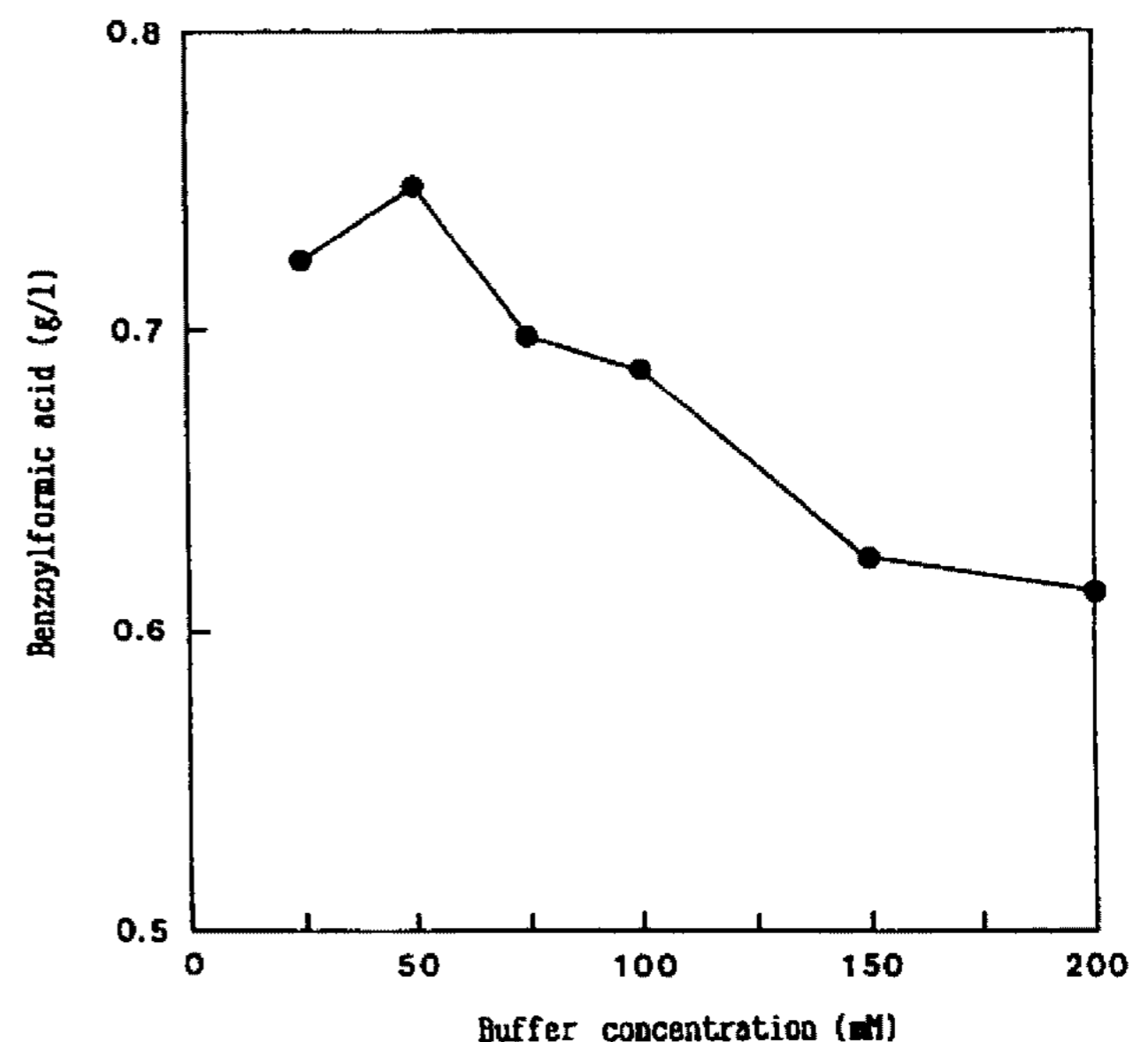


Fig. 4. Effect of buffer concentration on the benzoylformic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 6 hr at 30°C in the reaction mixture containing 50 g/l (wet weight) of cell concentration and 0.2% of DL-phenylglycine (pH 7.2).



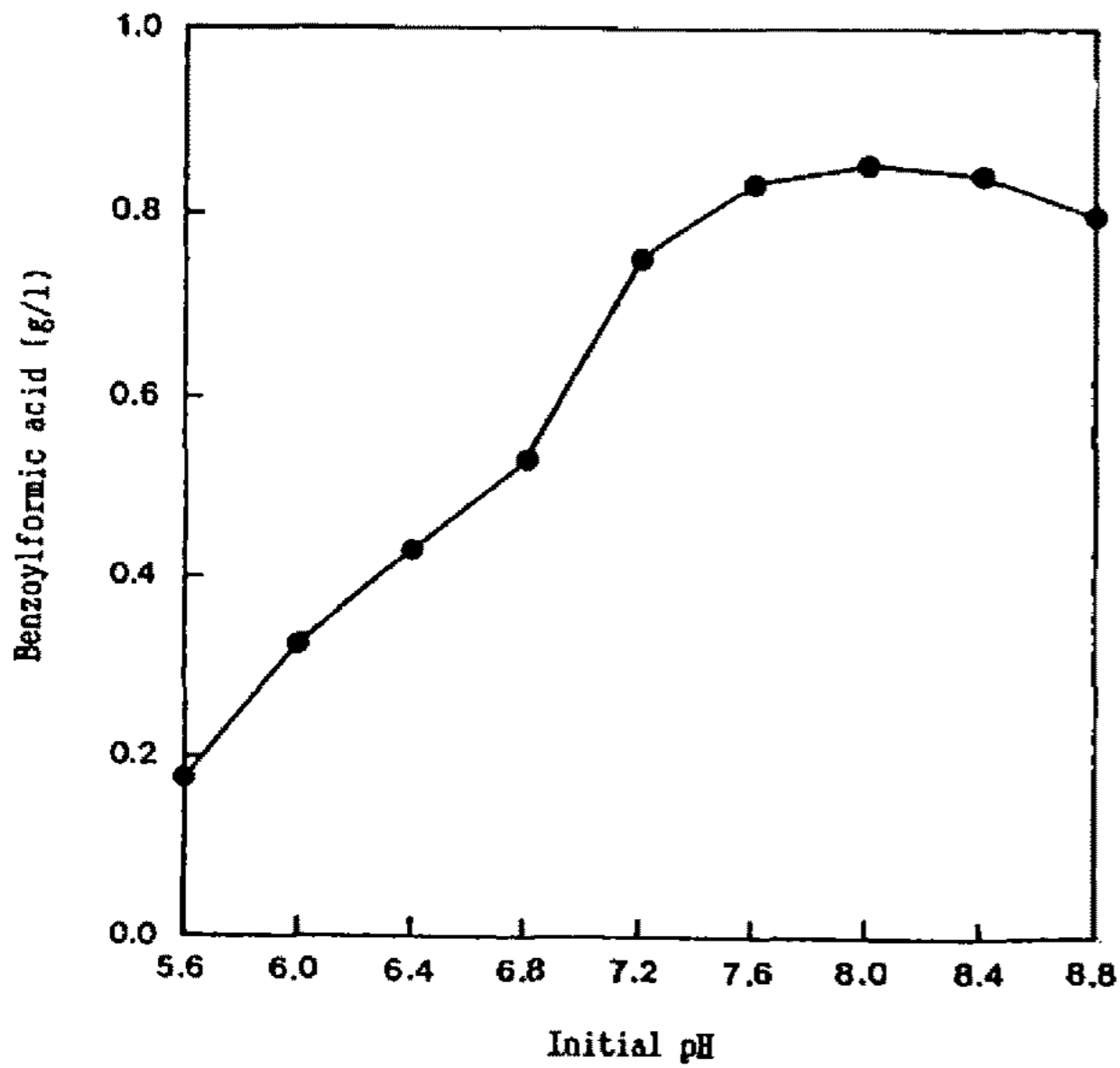


Fig. 5. Effect of pH on the benzoylformic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 6 hr at 30°C in the reaction mixture containing 50 g/l (wet weight) of cell concentration, 0.2% of DL-phenylglycine and 50 mM potassium phosphate buffer.

0.85 g/l로서 최대량을 나타내었으며, pH가 8.0 이상에서는 benzoylformic acid의 생산량이 감소하는 경향을 보였다. 따라서, 이후의 실험에서는 반응액의 초기 pH를 8.0으로 조정하여 실험을 수행하였다.

**Benzoylformic acid 생산에 미치는 반응온도의 영향**  
휴지세포에 의한 benzoylformic acid의 생산에 있어서 온도가 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응액의 반응온

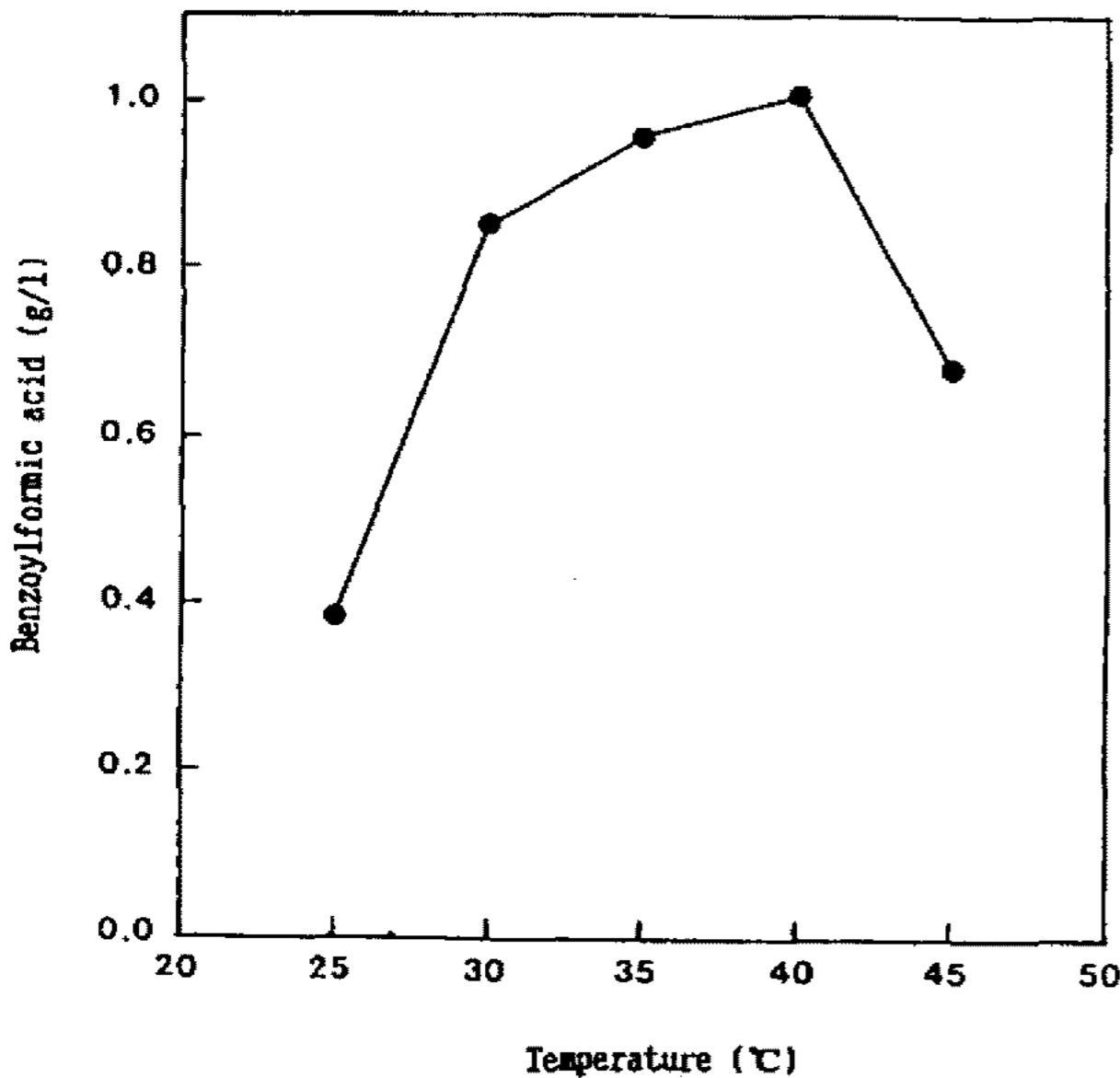


Fig. 6. Effect of temperature on the benzoylformic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 6 hr in the reaction mixture containing 50 g/l (wet weight) of cell concentration, 0.2% of DL-phenylglycine and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0).

Table 4. Production of benzoylformic acid from optically active forms of phenylglycine

Substrates	Substrate (g/l)	Benzoylformic acid	Conversion yield (%)
DL-Phenylglycine	2.0	1.01	50.5
D-Phenylglycine	1.0	0.02	2.0
L-Phenylglycine	1.0	1.00	100

\*Reaction was carried out for 6 hr at 40°C in reaction mixture containing 50 g/l (wet weight) of cell concentration and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0).

도를 25°C에서 45°C까지 변화시켜 benzoylformic acid의 생산량을 검토하였다. Fig. 6에 나타난 바와같이 40°C에 이르기까지는 반응온도가 상승함에 따라 benzoylformic acid의 생산량도 급격히 증가하였지만, 40°C 이상의 온도에서는 온도가 증가함에 따라 급격히 감소하는 결과를 나타내었다. 따라서 반응액의 반응 최적온도는 40°C이었고 이때의 benzoylformic acid의 생산량은 1.01 g/l이었다.

**광학활성이 다른 phenylglycine으로부터 benzoylformic acid 생산** 본 균주의 benzoylformic acid producing activity 특성을 살펴보기 위하여 반응액에 각각 D-phenylglycine, L-phenylglycine, DL-phenylglycine을 기질로 넣어준 후, 상기의 반응조건에서 반응시켜 생산된 benzoylformic acid를 확인하였다. Table 4에 나타난 바와같이, 1.0 g/l의 L-phenylglycine을 기질로 사용한 경우 1.0 g/l의 benzoylformic acid가 생산되어 100% 전환율을 보였으며, 1.0 g/l의 D-phenylglycine을 기질로 사용하였을 때 2.0% 만이 benzoylformic acid로 전환되었다. 또한 2.0 g/l의 DL-phenylglycine을 기질로 사용하였을 때 1.01 g/l의 benzoylformic acid가 생산되어 50.5%의 전환율을 보였다.

상기의 결과로부터 본 균주는 benzoylformic acid의 생산에 있어서 L-phenylglycine을 기질로 사용하며 D-phenylglycine은 거의 전환시키지 못하였다. 따라서 DL-phenylglycine을 기질로 사용한 경우 생산된 benzoylformic acid는 L-phenylglycine으로부터 전환된 것이다.

**시간 경과에 따른 benzoylformic acid의 생산** 상기의 실험 결과로부터 얻어진 최적조건하에서 *Bacillus* sp. YH-001의 휴지세포에 의한 DL-phenylglycine으로부터 생산된 benzoylformic acid의 경시적 변화는 Fig. 7에 나타난 바와 같다. 반응후 5시간에 이르기까지는 benzoylformic acid의 생산량은 계속적으로 증가하였으며 그 이후에는 더이상 증가하지않고 거의 일정한 경향을 나타내었다. 또한 사용한 기질인 DL-phenylglycine은 반응초기부터 급격히 감소하였으며 5시간 이후에는 더이상 감소하지않고 일정하게 남아있었으며 이것은 이용되지 않는 D-phenylglycine으로 추정되었다. 6시간 반응시켰을 경

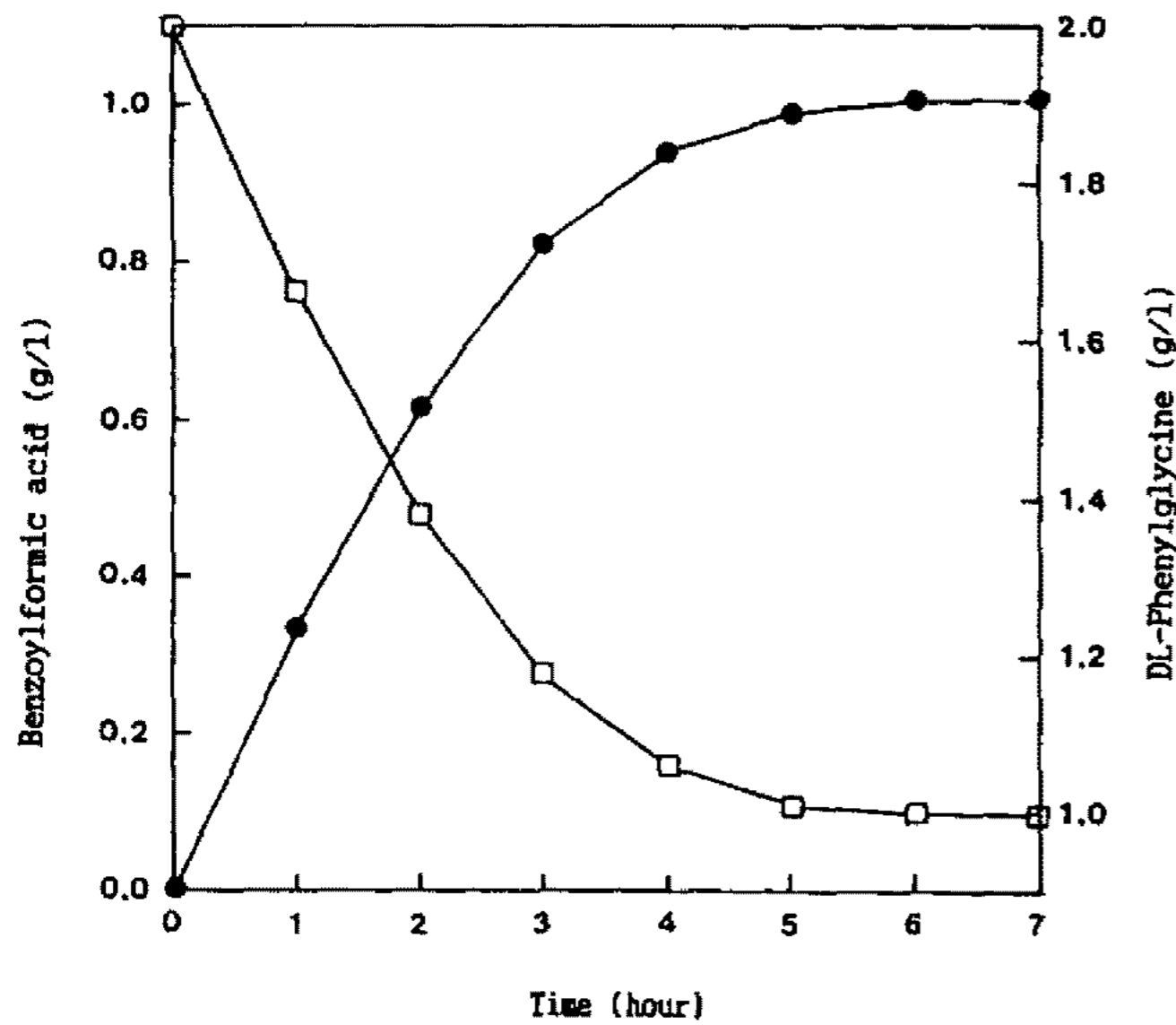


Fig. 7. Time course of the benzoylformic acid production with resting cells.

Reaction was carried out at 40°C in the reaction mixture containing 50 g/l (wet weight) of cell concentration, 0.2% of DL-phenylglycine and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0). Benzoylformic acid (g/l): ●—●, DL-Phenylglycine (g/l): □—□

우 최대 benzoylformic acid의 생산량은 1.01 g/l였으며, DL-phenylglycine에서의 전환율은 50.5%였고 L-phenylglycine으로부터의 전환율은 100%이었다.

### 요 약

DL-Phenylglycine으로부터 benzoylformic acid를 생산하기 위하여, benzoylformic acid 생성능이 있는 8종의 균주를 토양으로부터 분리하였다. 분리한 균주들중 YH-001 균주가 benzoylformic acid 생산 능력이 가장 우수하였고, *Bacillus* sp.로 부분동정하였다.

Benzoylformic acid 생산에 있어서, 반응액과 반응조건을 최적화하였으며 그 결과는 다음과 같았다. 반응혼

합액은 2 g의 DL-phenylglycine과 50 g의 균체를 포함한 1 l의 50 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0)이었으며, 반응은 40°C에서 교반시켜 수행하였다. 6시간의 반응후, 1.01 g/l의 benzoylformic acid가 생산되었고 이때의 DL-phenylglycine으로부터의 전환율은 50.5%이었다.

### 참고문헌

1. Yamazaki Y. and H. Maeda. 1986. Enzyme Synthesis of Optically Pure R-(-)-Mandelic Acid and Other 2-Hydroxycarboxylic Acids: Screening for the Enzyme, and Its Purification, Characterization and Use. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2621-2631.
2. 山崎幸苗, 前田英勝. 1988. 酵素法によるマンデル酸の左旋性光學活性體の製造方法 日本公開特許公報, 昭 63-32492.
3. 石村文廣, 石川賞, 秋山正治, 高田正樹. 1990. 光學活性なマンデル酸の製造 日本公開特許公報, 平 2-53497.
4. 山崎幸苗, 梶原茂. 1988. (-)-マンデル酸生産バイオリアクタ- *BioIndustry*. **5**: 261-268.
5. Then J., W. Avetz, and K. Sauber. 1990. Verfahren zur Herstellung von L-Phosphinothricin. *Eur. Pat. Appl.* EP 374651.
6. Kope H. H., Y. S. Tsantrizos, J. A. Fortin and K. K. Ogilvie. 1991. p-Hydroxybenzoylformic acid and (R)-(-)-p-hydroxymandelic acid, two antifungal compounds isolated from the liquid culture of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arhizus*. *Can. J. Microbiol.* **37**: 258-264.
7. Hiroshi K., A. Isobe, Y. Izumi and H. Yamada. 1990. Production of Benzoylformic Acid from Phenylglycine by *Sacchromycopsis lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2101-2105.
8. Sneath P. H. A., N. S. Nair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2 The Williams and Wilkins Co. Baltimore.

(Received 19 May 1997)