

세균성 리파제의 분자구조와 작용기작

김형권*

가톨릭대학교 생명공학부

Molecular Structures and Catalytic Mechanism of Bacterial Lipases. Kim, Hyung Kwoun*. *Div. of Biotechnology, The Catholic University of Korea, 43-1, Yokkok 2-dong, Wonmi-gu, Bucheon, Gyeonggi-do, 420-743, Korea* – Bacteria produce lipases, which can catalyze both the hydrolysis and the synthesis of long chain triglycerides. These reactions usually proceed with high regioselectivity and enantioselectivity, and, therefore, lipases have become very important biocatalysts used in organic chemistry. 3D lipase structures were solved from several bacterial lipases. They have an α/β hydrolase fold and a catalytic triad consisting of a nucleophilic serine, and an aspartate or glutamate residue that is hydrogen bonded to a histidine. Active sites are covered with α -helical lid structure, of which movement is involved in the enzyme's activation at oil/water interface. Four substrate binding pockets were identified for triglycerides: an oxyanion hole and three pockets accommodating the fatty acids bound at positions sn-1, sn-2, and sn-3. These pockets determine the enantioselectivity of a lipase. The understanding of structure-function relationships as well as the development of molecular evolution techniques will enable researchers to tailor new lipases for biotechnological applications.

Key words: Bacterial lipase, 3D structure, catalytic triad, interfacial activation, substrate specificity

리파제는 지방의 에스테르결합을 가수분해하는 효소(E.C. 3.1.1.3)이다. 리파제의 생체내 주기능은 이와 같이 지방의 가수분해이지만, 반응조건에 따라서 지방이외의 다양한 에스테르 화합물의 가수분해를 수행할 수 있을 뿐만 아니라, 에스테르 합성반응과 트랜스에스테르화 반응등 다양한 효소 전환반응(Fig. 1)을 촉매할 수 있기 때문에 세제산업, 제약 산업, 정밀화학산업, 환경산업, 식품산업등에서 매우 중요하게 이용되고 있다.

리파제는 Eberle(1834년)와 Bernard(1856년)에 의해 채장에서 처음 발견된 이래, 각종 동물, 식물, 곰팡이 그리고 세균으로부터 많은 종류의 리파제가 발견되었다. 그 중에서도 미생물(곰팡이 및 세균)이 생산하는 리파제가 다양한 기질특이성, 위치특이성, 입체특이성을 갖고 있어서 산업적으로 많이 이용되고 있다.

1990년대에 들어서 채장 리파제의 X선 결정구조[62]가 밝혀진 이후에 *Rhizomucor miehei*[3, 4], *Geotrichum candium* [44], *Candida rugosa*[11] 등의 곰팡이 리파제 구조가 연이어 밝혀졌으며, 세균성 리파제로는 *Burkholderia glumae* 리파제구조가 1993년에 처음으로 밝혀졌다[34]. 이후에 *Burkholderia cepacia*[21, 26, 43], *Pseudomonas aeruginosa* [33], *Bacillus subtilis*[20, 59], *Bacillus stearothermophilus* [18, 54] 등의 세균성 리파제 구조가 밝혀지게 되었다.

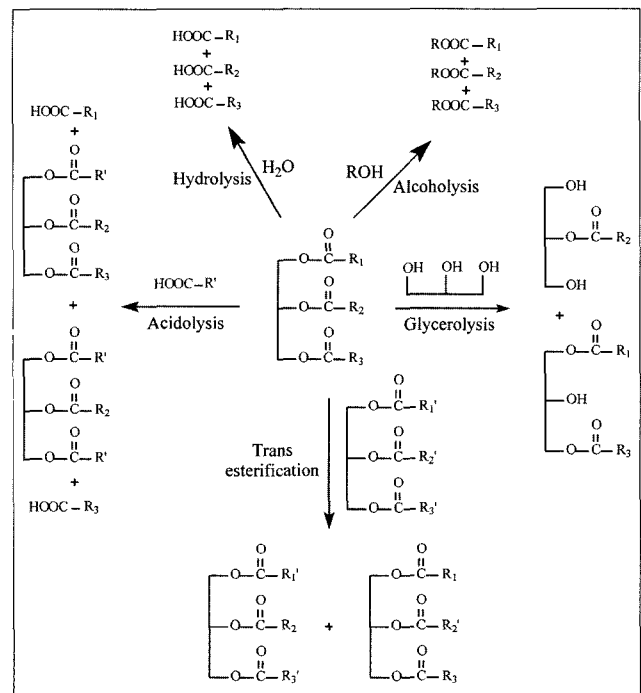


Fig. 1. Biotransformation of fats and oils by lipases.

현재 이러한 리파제의 3D구조를 기반으로 효소의 작용기작과 반응특이성에 대한 해석이 이루어지고 있으며, 리파제 효소를 산업적으로 이용하기 위해 효소의 분자개량도 활발히 진행되고 있다.

*Corresponding author
Tel: 82-32-340-3890, Fax: 82-32-340-3865
E-mail: hkkim@catholic.ac.kr

Table 1. Classification of bacterial lipases

Family	Subfamily	Enzyme-producing species	Accession no.	Similarity	Properties	PDB-id
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	D50587	100	True lipases	1EX9
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF031226	95		
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57		
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43		
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40		
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39		
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38		
	2	<i>Burkholderia glumae</i>	X70354	35		1QGE, 1TAH 1CVL 1HQD, 3LIP, 5LIP, 1OIL, 2LIP
		<i>Chromobacterium viscosum</i>	Q05489	35		
		<i>Burkholderia cepacia</i>	M58494	33		
		<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33		
	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	D11455	14		
		<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15		
	4	<i>Bacillus subtilis</i>	M74010	16		1ISP, 1I6W
		<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13		
	5	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	Phospholipase	1KU0, 1J13
		<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14		
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14		
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13		
	6	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14		
<i>Streptomyces cinnamomeus</i>		U80063	14			
II	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	100	o.m.-bound esterase Acyltransferase o.m.-bound esterase	1ESC	
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	31			
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	17			
	<i>Photorhabdus luminescens</i>	P40601	17			
	<i>Streptomyces scabies</i>	M57297	15			
III	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	M86351	100	Extracellular lipase	1JFR	
	<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82			
	<i>Moraxella</i> sp.	X53053	33			
IV	<i>Moraxella</i> sp.	X53868	100	Lipase 2 Carboxylesterase	1JJI 1EVQ	
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	28			
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	25			
	<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AF034088	24			
	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	24			
	<i>Escherichia coli</i>	AE000153	20			
V	<i>Moraxella</i> sp.	X53869	100	Lipase 3 PHA-depolymerase Putative esterase Esterase Esterase		
	<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	88			
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	34			
	<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	34			
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	25			
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	15			
VI	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S79600	100	Esterase	1AUO	
	<i>Synechocystis</i> sp.	D90904	24			
	<i>Spirulina platensis</i>	S70419	22			
	<i>Richettsia prowazekii</i>	Y11778	16			
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	15			

세균성 리파제의 종류
단백질 데이터뱅크(GenBank, Swiss Protein Sequence Database, The Protein Information Resource, The Protein

Research Foundation Database, The Brookhaven Protein Databank)에 등록된 단백질을 조사하면 총 200여종의 세균 유래의 지질가수분해효소를 찾을 수 있다. 이 중에서 동일하

거나 유사한 효소를 제외하면 약 47종류의 리파제가 남게 되며, 이것들을 효소 생산균주와 각각의 아미노산 서열의 상동성을 기준으로 분류하면 6개의 Family(I~VI)로 나누어진다(Table 1)[16].

Family I에는 22종류의 리파제가 속해 있으며, 이것들은 다시 6개의 subfamily(I.1~I.6)로 세분된다. Subfamily I.1과 I.2는 기존의 *Pseudomonas* 그룹 I와 그룹 II 리파제에 해당되며, 각각의 리파제 유전자는 Lif (lipase-specific foldase)라고 불리는 ‘molecular chaperone’의 유전자와 함께 하나의 오페론을 구성하고 있다[17]. 이들 리파제의 공통점은 ‘secretion type II’ 경로를 통해 세포 밖으로 분비된다는 점이다. 반면에 subfamily I.3에 속하는 리파제는 ABC분비시스템인 ‘secretion type I’ 경로를 통해서 세포 밖으로 분비된다. Subfamily I.4에는 중온성 바실러스 리파제가 포함되어 있으며, 지금까지 밝혀진 리파제 효소 중에서 분자크기가 가장 작다(19.6 kDa). Subfamily I.5에는 고온성 바실러스 리파제가 포함되어 있으며, 이것들은 subfamily I.4 리파제와 함께 산업적으로 많이 이용되고 있다[47]. Subfamily I.5에는 그람양성세균인 *Staphylococcus hyicus* 및 *S. aureus* 리파제가 포함되어 있다[48].

Family II는 세포내 기능이 아직 명확하게 밝혀지지 않은 지질가수분해 효소들로 구성되어 있다[56]. Autotransporter인 *P. aeruginosa* 외막 에스테라제도 포함된다[29]. *Streptomyces scabies* 리파제의 3D 구조를 분석한 결과, 대부분의 리파제구조에서 관찰되는 α/β hydrolase fold와는 상당히 다른 단백질 구조를 갖고 있음이 밝혀져서 흥미를 끌고 있다.

Family III는 *Streptomyces* 및 *Moraxella* 유래의 리파제로 구성되어 있다.

Family IV는 포유동물의 ‘hormone-sensitive lipase’와 유사한 분자생물학적 특성을 갖고 있는 저온성 리파제로 구성된다[27]. 이 효소의 특징은 활성부위의 세린이 단백질 N말단에 가까이 위치한 GDSAG서열상에 있으며, HGGG모티프를 갖는다는 것이다. 흥미롭게도 이곳에는 저온성균(*Moraxella* sp., *Pseudomonas* sp. B11-1)과 고온성균(*Archaeoglobus fulgidus*)이 생산하는 리파제가 동시에 포함되어 있다.

Family V에도 저온성균(*Psychrobacter immobilis*)과 고온성균(*Sulfolobus acidocaldarius*) 유래의 리파제가 동시에 포함되어 있다. 이들 효소는 특이하게도 dehalogenase, haloperoxidase, epoxide hydrolase와 아미노산 서열에서 유사성을 보인다.

Family VI는 게놈분석을 통해 발굴된 효소(*Synechocystis* sp., *Chlamydia trachomatis*)를 포함하고 있다. 이것들은 단백질의 크기가 비교적 작고 포유동물의 lysophospholipase와 유사하며, 세균의 세포질에 분포하고 있는 것으로 밝혀졌다.

세균 리파제의 3D 구조

앞서 언급한대로 1990년대 들어서서 리파제의 3D구조에 대한 연구가 활발히 진행되었으며, 이것을 통해 리파제의 작용기작이 밝혀졌을 뿐만 아니라, 위치특이성과 입체특이성에 관련된 단백질 구조가 밝혀지게 되었다. 사람의 췌장 리파제[62]와 곰팡이 *Rhizomucor miehei* 리파제[3, 4]의 X선 결정구조가 처음으로 밝혀진 이후에, 여러 가지 곰팡이 리파제 구조가 밝혀졌다(*Geotrichum candidum*[44], *Fusarium solani*[32], *Candida rugosa*[11], *Candida antarctica*[55], *Humicola lanuginosa*[6], *Rhizopus delemar*[6]). 세균 리파제의 구조연구는 비교적 늦게 진행되었다. *Burkholderia glumae* 리파제 구조가 1993년에 밝혀지고[34], 수년 후에 *Chromobacterium viscosum*[25](*B. glumae*와 동일한 것으로 밝혀짐[52])와 *Burkholderia cepacia*[21, 26, 43] 리파제 구조가 밝혀졌다. 그 후에, *Streptomyces exfoliatus*[61], *Streptomyces scabies*[60] 리파제와 *P. fluorescens* 에스테라제[22]의 구조가 밝혀졌으며, 최근 들어, *Pseudomonas aeruginosa*[33], *Bacillus subtilis*[20, 59]와 *Bacillus stearothermophilus*[18, 54] 구조가 밝혀졌다(Table 2).

리파제의 구조연구가 진행됨에 따라서 중요한 사실이 밝혀졌다. 단백질의 아미노산 서열간에 유사성이 없음에도 불구하고 리파제의 단백질 폴딩구조가 대부분 유사하다는 점이다. 사실 리파제는 다른 종류의 효소들(haloalkane dehalogenase, acetylcholinesterase, dienelactone hydrolase, serine carboxypeptidase)과도 동일한 폴딩패턴을 갖고 있음이 밝혀졌는데, 이런 구조를 ‘ α/β hydrolase fold’라고 부른다.

전형적인 ‘ α/β hydrolase fold’는 같은 방향으로 나란한 8개의 β 가닥으로 구성되어 있다(두 번째 β 가닥은 반대방향으로 위치하고 있다). 세 번째부터 여덟 번째까지 6개의 β 가닥은 α 나선으로 연결되어 있는데, 이들 α 나선은 β 평판구조의 양쪽에 각각 나누어져 위치하고 있다. β 평판구조는 ‘left-handed superhelical twist’ 구조를 이루고 있으며, 처음(β 1)과 마지막(β 8) β 가닥간에는 약 90°의 각도를 이루고 있다. 하지만 β 평판구조의 뒤틀림 정도와 α 나선의 위치는 효소의 종류에 따라 각각 다양하다. 단백질의 C말단 쪽에 위치한 4개의 β 가닥의 C말단부위가 기질과 결합하는 ‘subdomain’을 형성하고 있으며, 이 부분의 길이와 구조적 차이에 의해서 다양한 기질특이성이 나타나게 된다.

리파제의 경우에도 약간의 차이가 있지만 전형적인 ‘ α/β hydrolase fold’ 구조를 갖고 있다(Fig. 2)[42]. *Bacillus subtilis*, *B. glumae*, *B. cepacia*, *C. viscosum* 리파제는 단백질 구조의 중심에 6개의 β 가닥(β 3~ β 8)으로 구성된 β 평판구조가 위치하고 있다(Fig. 3). 반면에 *Pseudomonas fluorescens* carboxylesterase는 7개의 β 가닥(β 2~ β 8)으로 구성되어 있고, *S. exfoliatus* 리파제는 β 9를 포함하여 총 9개의 β 가닥을 갖고 있다. *B. stearothermophilus* 리파제는 β 9를 포함하여 총 7개의 β 가닥을 갖고 있다(Fig. 3).

Table 2. PDB-id of lipase structures

Species	Enzyme	PDB-id (complexed with)
human	lipoprotein lipase	1O8T (micelle)
	pancreatic lipase	1N8S (colipase)
	gastric lipase	1HLG
	bile salt-activated lipase	1JMY, 1F6W
rat	pancreatic lipase	1BU8
dog	gastric lipase	1K8Q (phosphonate inhibitor)
	pancreatic lipase	1RP1
bovine	cholesterol esterase	2BCE
	bile salt-activated lipase	1AKN, 1AQL (taurocholate)
pig	lipase	1ETH (colipase), 1LPA (phospholipid), 1LPB (undecane phosphonate methyl ester)
guinea pig	lipase	1GPL
horse	lipase	1HPL
<i>Candida cylindracea</i>	cholesterol esterase	1LLF, 1CLE (cholesteryl linoleate)
<i>Candida antarctica</i>	lipase	1LBS, 1LBT, 1TCC, 1TCB, 1TCA
<i>Candida rugosa</i>	lipase	1LPM ((1r)-menthyl hexyl phosphonate), 1CRL, 1TRH,
		1LPN (dodecanesulfonate), 1LPO (hexadecanesulfonate), 1LPP (hexadecanesulfonate), 1LPS ((1s)-menthyl hexyl phosphonate)
<i>Galactomyces geotrichum</i>	lipase	1THG
<i>Penicillium camemberti</i>	lipase	1TIA
<i>Rhizomucor miehei</i>	lipase	5TGL (N-hexylphosphonate ethyl ester), 4TGL (diethylphosphonate), 3TGL, 1TGL
<i>Rhizopus niveus</i>	lipase	1LGY
<i>Rhizopus oryzae</i>	lipase	1TIC
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	lipase	1GT6 (oleic acid), 1EIN, 1DU4, 1DTE, 1DT5, 1DT3, 1TIB
<i>Burkholderia glumae</i>	lipase	1QGE, 1TAH
<i>Chromobacterium viscosum</i>	lipase	1CVL
<i>Burkholderia cepacia</i>	lipase	1HQD (1-phenoxy-2-acetoxy butane), 5LIP (Rc-(Rp,Sp)-1,2-dioctylcarbamoyl-glycero-3-O-octylphosphonate), 3LIP, 1OIL, 2LIP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	lipase	1EX9 (Rc-(Rp,Sp)-1,2-dioctylcarbamoyl-glycero-3-O-octylphosphonate)
<i>Pseudomonas sp.</i>	lipase	4LIP (Rc-(Rp,Sp)-1,2-dibutylcarbamoyl-glycero-3-O-butylphosphonate)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	esterase	1AUO
<i>Bacillus subtilis</i>	lipase	1ISP, 116W
	brefeldin A esterase	1JKM
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	lipase	1JI3, 1KU0
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	carboxylesterase	1JJI
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	carboxylesterase EST2	1EVQ
<i>Streptomyces exfoliatus</i>	lipase	1JFR
<i>Streptomyces scabies</i>	esterase	1ESC

리파제의 활성부위

전형적인 ' α/β hydrolase fold' 효소들의 활성부위에는 3개의 아미노산이 위치하고 있다. 즉, 친핵성 아미노산(세린, 시스테인, 아스팔탄산)과 산성 아미노산(아스팔탄산, 글루타민산) 그리고 히스티딘이 효소의 활성부위를 구성하고 있다 (Fig. 4).

지금까지 보고된 바에 의하면, 리파제에서는 세린만이 친핵성 아미노산으로 작용하며, 아스팔탄산 또는 글루타민산이 산성 아미노산으로 작용한다. 친핵성 세린은 'conserved

pentapeptide'라고 불리는 Gly-X-Ser-X-Gly 서열상에 위치하고 있다[35]. 또한, $\beta 5$ 와 연결된 α 나선 사이에서 γ 전환구조를 형성하고 있다. 이러한 'strand-nucleophile-helix' 구조는 'nucleophile elbow'라고 불리어지며, 세린이 한쪽으로 활성부위 히스티딘과 연결되고 다른 쪽으로 기질과 연결되는 것을 가능하게 해준다. 이때 세린은 α 나선의 N말단에 위치하기 때문에 효소반응과정에서의 'tetrahedral intermediate'를 안정하게 만들 수 있다.

전형적인 ' α/β hydrolase fold'에서는 활성부위 산성 아미

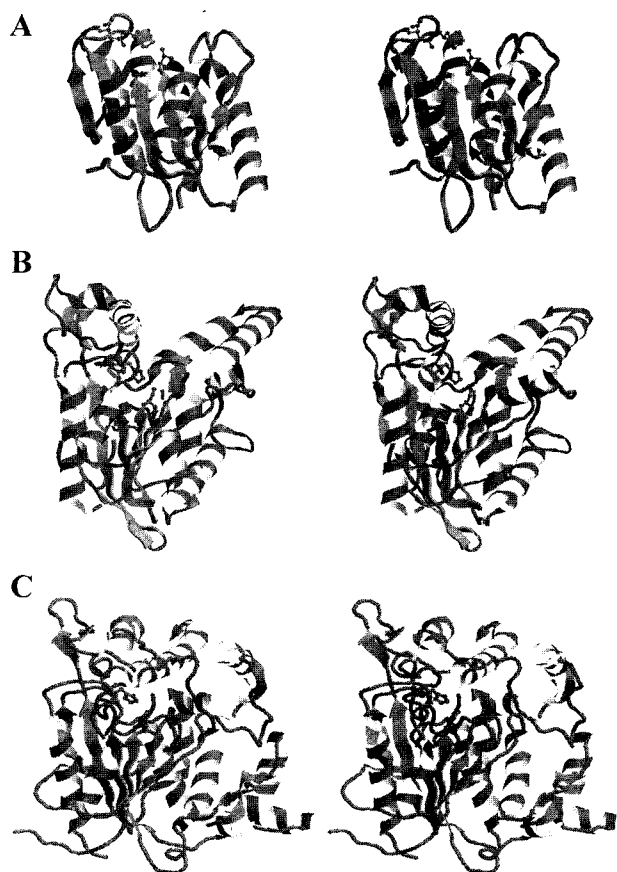


Fig. 2. Representation of structures of three bacterial lipases. A; *Bacillus subtilis* lipase, B; *Burkholderia cepacia* lipases, C; *Bacillus stearothersophilus* lipase.

노산이 $\beta 7$ 다음에 나타나는 ‘reverse turn’에 위치한다. 하지만 효소에 따라서 위치에 차이가 있다. 예를 들면, 췌장 리파제는 $\beta 6$ 다음에 산성 아미노산이 위치한다[62]. *G. candidum* 리파제의 경우, 효소재설계 기법으로 산성 아미노산을 $\beta 7$ 에서 $\beta 6$ 다음으로 옮겨도 활성을 측정할 수 있었다[54]. 한편, 활성부위 히스티딘은 $\beta 8$ 다음의 루프구조에 위치한다.

리파제의 작용기작

리파제는 아실글리세롤의 카르복실에스테르결합을 가수분해하여 지방산과 글리세롤을 만드는 효소이다. 활성부위가 세린-히스티딘-아스파탐산/글루타민산으로 구성된 ‘catalytic triad’로 되어 있기 때문에 세린계 단백질분해효소와 유사한 작용기작에 의해서 촉매반응을 수행하게 된다.

구체적인 작용기작은 다음과 같다(Fig. 5). 친핵성 세린의 수산화기의 산소원자가 기질의 카르보닐 탄소를 공격한다. 그 결과로 카르보닐 탄소를 중심으로 ‘tetrahedral intermediate’가 형성된다. 이러한 구조는 나선C의 ‘helix macrodipole’에 의해 안정화된다. 또한 음전기를 갖는 카르보닐 산소(옥시음이온, oxyanion)와 두 개의 주시슬 NH기(옥시음이온 구

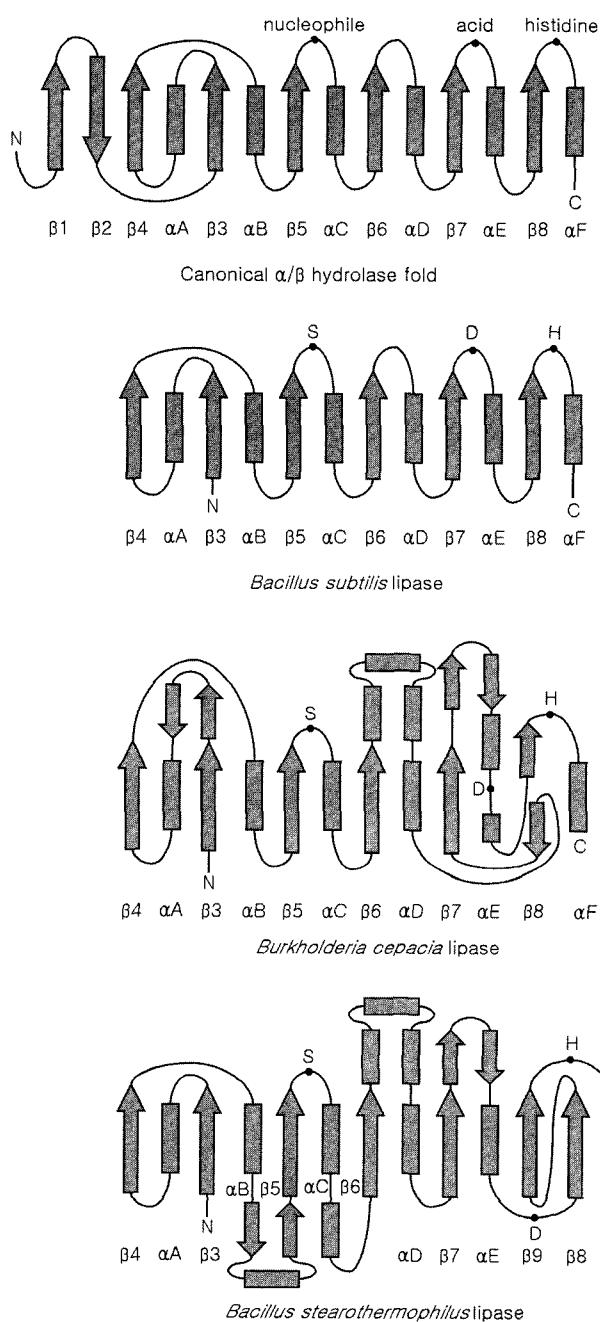


Fig. 3. Secondary structure topology of the canonical α/β hydrolase fold, *B. subtilis* lipase, *B. cepacia* lipase, and *B. stearothersophilus* lipase.

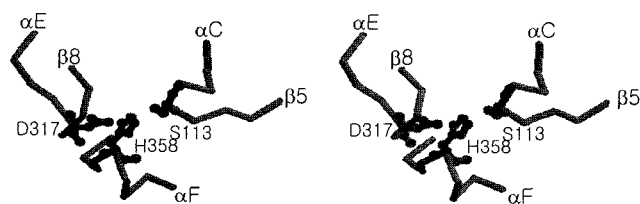


Fig. 4. The catalytic triad residues of *B. stearothersophilus* lipase.

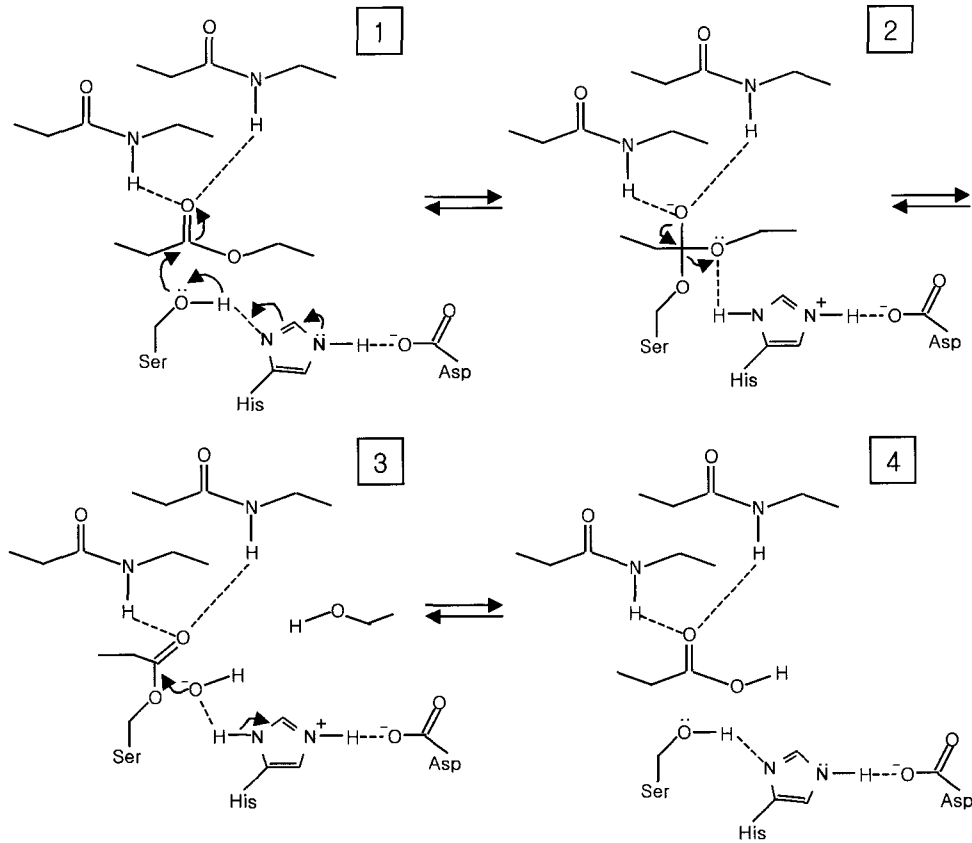


Fig. 5. Reaction mechanism of lipases.

명, oxyanion hole)간의 소수결합에 의해서도 안정화된다. 두 개의 NH기 중에서 하나는 활성 세린의 바로 다음에 위치한 아미노산의 것이고, 다른 하나는 β3가닥의 끝에 있는 아미노산의 것이다. 활성 세린의 수산화기로부터 양성자가 활성 히스티딘으로 전달되면서 활성화된다. 이때 양성자를 전달 받은 히스티딘의 이미다졸 고리는 산성 아미노산에 의해 안정화된다. 이후 양성자가 에스테르결합의 산소원자에 전달되면서 알코올이 떨어져 나가고 아실부위만이 활성 세린에 결합된다(covalent intermediate). 이후에 물분자에 의해서 탈아실화반응이 진행된다. 즉, 활성부위 히스티딘이 물분자의 양성자를 끌어당기고 이때 생성된 수산화이온이 카르보닐 탄소를 공격한다. 이때 다시 'tetrahedral intermediate'가 만들어지고 히스티딘으로부터 세린의 산소원자쪽으로 양성자가 전달되면서 아실기가 떨어진다. 결과적으로 효소는 또 다른 기질을 분해할 수 있는 준비상태로 된다.

계면활성화 현상

지질기수분해 효소는 미셀 또는 에멀전에 의해 형성되는 물과 지질의 경계면에서 효소활성이 급격히 증가하는 '계면활성화' 현상을 보인다. 경계면이 없는 환경에서는 리드라고 불리는 나선구조에 의해 효소의 활성부위가 덮여 있다. 하지만 경계면이 나타나면 리드가 움직여서 효소표면에서 소

수성 부위가 증가하고 활성부위가 기질의 접근이 가능하게 된다(Fig. 6). 리드 부위는 양친성 나선이 한 개 또는 두 개로 구성되어 있거나 루프구조로 이루어져 있다. 하지만, 모든 리파제가 계면활성화 현상을 보이는 것은 아니다. *B. subtilis* 리파제, cutinase, 기니피그 췌장 리파제는 리드를 갖고 있지 않으며 계면활성화 현상도 나타나지 않는다.



Fig. 6. Representation of structure of *Burkholderia glumae* lipase. The movement of the lid structure (Thr137~Leu149) was indicated. The detailed structure shows that the lid is an amphipathic α-helix.

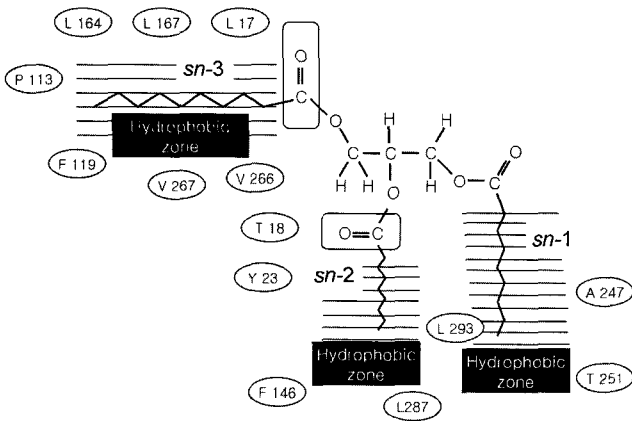


Fig. 7. Active site of *Burkholderia cepacia* lipase.

기질결합부위

리파제의 중요한 특성중의 하나인 입체특이성을 규명하기 위해서 기질의 아실기와 알코올기의 결합부위에 대해 연구가 진행되었다(Table 2). 주로 곰팡이 리파제인 *Candida rugosa*[12], *Rhizomucor miehei*[5]리파제와 세균성 리파제인 *B. cepacia* 리파제[24, 26]를 대상으로 여러 가지 기질유사물질 이용한 구조연구가 수행되어 왔다.

특히, *B. cepacia* 리파제의 구조연구를 통해서(Fig. 7) 옥시음이온 구멍과 sn-1, sn-2, sn-3지방산과 결합하는 3개의 포켓이 확인되었다. 부메랑 형태의 활성부위는 두부분으로 나누어져 있다. 기질의 sn-3 아실기와 결합하는 소수성 홈과 기질의 알코올부위와 결합하는 부위로 나누어진다. 후자는 sn-2 부위

와 결합하는 친수성/소수성 틈과 sn-1 부위와 결합하는 작은 소수성 홈으로 나누어진다. 이때에 반데르발스 힘이 효소와 기질간의 주된 결합력이다. 또한, sn-2 지방산의 에스테르 산소원자와 활성부위 히스티딘의 NE2 원자간의 수소결합이 기질의 위치를 결정하는데 중요하며, sn-2 포켓이 기질에 대한 효소의 입체특이성을 결정하는데 가장 중요함이 밝혀졌다.

현재, *B. cepacia* 리파제는 2차 알코올 에스테르의 입체특이적 분할에 널리 이용되고 있다[53]. 이것은 이 효소가 Sc보다 Rc에 대한 활성이 크기 때문이다[26]. Sc-TC8 화합물을 이용한 구조 모델링을 수행한 결과, 1차 수산화기에 결합된 아실기가 Leu287 및 Ile290 잔기와 공간적으로 겹치는 것이 확인됐다[24, 26]. Hirose등은 위치특이적 변이 실험을 통해 입체특이성에 중요한 아미노산을 밝혀고(V266, Leu287), 이 아미노산을 변형시킴으로써 단백질의 입체특이성이 Rc로부터 Sc로 바뀔을 확인하였다[13]. Val266은 sn-3 포켓에 위치하고 Leu287은 sn-2 포켓에 위치하는 아미노산임을 밝혀짐에 따라, sn-1, -2, -3 포켓의 크기와 친수성/소수성 정도가 리파제의 입체특이성을 결정하는 데에 중요함이 확인되었다.

리파제의 효소개량

리파제의 구조와 기능에 대한 지식이 증가함에 따라서 리파제의 효소개량을 통해 산업적으로 유용한 신규 변이효소를 개발하고자 시도되고 있다(Table 3). 대부분의 효소개량은 세제용 효소로 이용하는 데에 목표를 두고 이루어 졌기 때문에, 기질특이성의 개량과 관련된 예가 많지 않지만, 몇 가지 예를 들면 다음과 같다.

Table 3. List of engineered lipases

Strain	Application	Effect of mutations	Ref.
<i>Humicola lanuginosa</i>	detergent additive	improvement of washing performance	[49]
		increase in thermostability	[50]
		improvement of resistance to proteolytic degradation	[51]
<i>Pseudomonas glumae</i>	detergent additive	improvement of resistance to oxidative degradation	[2]
		improvement of proteolytic resistance	[9]
<i>Pseudomonas mendocina/putida</i>	detergent additive in peracid bleaching systems	alteration of substrate specificity	[39]
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	detergent additive	improvement of perhydrolysis to hydrolysis ratio	[10]
		improvement of washing performance	[57]
<i>Rhizopus delemar</i>	biocatalysis	enhanced stability towards anionic surfactants	[1]
		alteration of chain length selectivity	[19]
<i>Pseudomonas mendocina</i> SD702	detergent, food, paper	increase of thermostability	[63]
<i>Fusarium solani pisi</i>	detergent additive	decrease of anionic sensitivity	[8]
		alteration of chain length selectivity	[8, 31]
		crystal structure	[14, 38]
<i>Candida antarctica B</i>	biocatalysis	alteration of substrate specificity	[37]
<i>Staphylococcus hyicus</i>	lipoprotein lipase	increase of oxidation stability	[37]
		alteration of phospholipase activity	[58]
<i>Geotrichum candidum</i>	lipoprotein lipase	alteration of substrate specificity	[15]
<i>lipoprotein lipase</i>		flap deletion (alteration of substrate specificity)	[7]
<i>human pancreatic lipase</i>	biocatalysis	flap deletion (alteration of substrate specificity)	[30]
<i>lysosomal acid lipase</i>		increase of cholesterol esterase activity	[36]

Rhizopus delemar 리파제의 경우, 기질의 아실기와 결합하는 부분인 F95, F112, V206, V209 아미노산을 변형시켜 중쇄 트리글리세리드에 특이적인 효소를 개발하였다[19]. *Pseudomonas mendocina* cutinase의 경우, S205, F207, Q127 아미노산을 변형시킴으로써 PNPB/PNPC 활성이 바뀔을 밝혔다[39]. *Geotrichum candidum*의 두 가지 리파제 GCL1과 GCL2에 대해 혼성효소를 제조하여 기질특이성이 바뀔을 확인하였다[15]. 또한, L357과 L358 아미노산이 이 효소의 기질특이성을 결정하는데 중요함을 밝혔다. Scheib 박사는 *Rhizopus oryzae* 리파제의 L254와 L258 아미노산이 sn-1과 sn-3에 대한 위치특이성을 결정함을 밝혔다[46]. *Humicola lanuginosa* 리파제의 리드부위인 87번과 89번 아미노산이 효소의 입체특이성을 결정하는 데에 중요함을 밝혀졌다[14].

ER-PCR을 이용해서 *P. fluorescens* 에스터라제[23]와 *P.*

aeruginosa 리파제[41]의 변이효소를 제조함으로써 한 종류의 에난치오머에 대한 활성이 증가된 변이효소를 얻었다. 그 결과 ee값이 2%에서 81%까지 증가되었다[40, 41].

리파제의 산업적 응용

리파제는 각종 동식물과 미생물에서 생산되고 있으며, 앞서 언급한대로 다양한 생화학적 반응을 촉매할 수 있다(Fig. 1). 또한, 리파제는 그 생산기원에 따라서 온도, pH, 유기용매 등의 물리화학적 반응조건에 대한 성질이 서로 다르며, 기질에 대한 사슬길이 특이성, 위치특이성, 입체특이성등도 각기 다르다. 리파제는 이러한 다양한 반응특성을 통해 각종 식품산업, 의약산업, 세제산업등에 널리 이용되고 있다(Table 4).

리파제는 1970년대부터 식품산업에서 향미성분 개발용 효소촉매로 이용되기 시작하였으며, 1980년대 중반부터 다양

Table 4. Industrial application of lipases

산업분야	제품 및 기술	용도
식품산업	지용성 페놀화합물	항산화제
	단쇄지방산 알코올 에스테르, 단쇄 치오에스테르, 제라닐 에스테르	향미성분
	포화지방산	소세지 발효
	불포화지방산, branched 지방산, 중쇄지방산	유제품의 향미성분, 치즈숙성
	식물성 기름 개질	마아가린, 코코아버터 대체품, 크림, 아이스크림
	구조 지방질 (structured lipid)	소화흡수력이 증가된 기능성 지방
	탄수화물-지방산 에스테르	식품 유화제
의약산업	nikkomycin-B, indomycin 등	항생제
	naproxen, ibuprofen, suprofein, ketoprofen 등	비스테로이드성 소염제
	lamivudine 등	항바이러스제
	acidic lipase	소화제 첨가물
	methyl 2-tetradecyloxiranecarboxylate	당뇨병치료제, 항산화제
	L-694458	섬유성 낭포증 치료제
	2-arylpropionic alkyl ester	항소염제
	PUFA-TG	두뇌발달, 면역증강, 동맥경화예방, 항암, 항알레르기
	gastric lipase	섬유성 낭포증 치료제
tetrahydrolipstatin(Orlistat)	비만예방	
바이오 센서산업	혈액 및 식품내 지방 정량 오염분석	불소오염, 살충제오염 측정
살충제 산업	synthon, ethynyl alcohol, vnylglycin, ivermectin, CPBA, HMPC 등	살충제, 제초제, 살균제
세제산업	효소세제, peracid 표백제	
피혁산업	피혁제조과정에서 피하지방 제거	
제지산업	목재내 지방 분해	
환경산업	슬러지, 오일폐기물, 폴리에스테르 분해, 냉각수관의 biofilm 제거, 공장배기가스 정화, 패스트-푸드 오일폐기물 처리	
화장품 산업	모노글리세리드, 디글리세리드, rose oxide, 탄수화물-지방산 에스테르, 폴리프로필렌-지방산 에스테르 등	유화제 및 향미성분
유화산업	비누, 지방산 생산, 모노글리세리드	

한 리파제 유전자가 클로닝되기 시작하였고, 현재 200여종의 리파제가 효소생화학적으로 연구되었으며, 이중에 40여종이 상업용 및 연구용 효소로 개발되었다. 세제산업의 경우, 1988년 Novo Nordisk사가 *Humicola lanuginosa* 리파제를 *Aspergillus oryzae*에서 대량생산하여 효소세제시장에서 판매하기 시작한 이후, 많은 종류의 세제용 효소가 개발되었다. 현재에는 Table 4에 나와 있는 것처럼 다양한 산업 분야에 리파제효소가 이용되고 있는데, 특히, 의약산업에서는 키랄소재의 중요성이 부각되면서 유기용매에 안정하고 위치특이성 및 광학활성을 갖는 리파제효소를 이용한 에스 테르화합물의 합성연구가 활발히 진행되고 있다. 이미 ibuprofen과 ketoprofen 등과 같은 고가의 키랄의약품의 효소합성이 가능하게 되었다.

지금까지의 내용을 종합해 본다면, 리파제의 삼차원 구조 분석을 통해 효소의 작용기작과 기질결합기작이 구체적으로 밝혀지고 있기 때문에, 이러한 정보를 기반으로한 컴퓨터 모델링과 위치특이적 변이단백질의 제조기법으로 효소개량이 가능하며, 특히, 리파제의 활성과 위치특이성 및 입체특이성이 개선된 산업용 맞춤형 효소를 신속하게 개발할 수 있는 시대가 곧 도래하리라 생각된다.

요 약

세균은 지방을 분해할 수 있는 다양한 리파제를 생산한다. 리파제는 반응조건에 따라서 지방의 합성도 수행할 수 있는데, 이러한 효소반응과정에서 고도의 기질특이성과 위치특이성 및 입체특이성을 보이기 때문에 제약산업과 정밀화학산업에서 효소촉매로서 널리 사용되고 있다. 지금까지 200종류 이상의 리파제효소가 보고되었으며, 이것들은 효소생산기원과 아미노산 상동성을 기준으로 6개의 family로 분류된다. 지난 10년 간 세균 리파제 6종에 대한 3D구조가 밝혀졌다. 이것들은 모두 중심부분에 α/β 폴딩구조와 세린, 히스티딘, 아스파틴산으로 구성된 활성부위를 공통적으로 갖고 있다. 활성부위를 양친성 α -나선구조가 뚜껑처럼 덮고 있으며, 물과 오일의 경계면을 만나면, 이 뚜껑이 열리고 효소활성이 크게 증가하는 '계면활성화' 현상을 보인다. *P. cepacia* 리파제 구조에는 기질과 결합하는 4개의 포켓이 있는데 이중 하나는 옥시음이온 구멍이고, 다른 세 개는 기질의 sn-1, sn-2, sn-3 지방산과 결합하는 부위이다. 이 포켓의 크기와 방향 및 소수성 정도에 의해서 효소의 기질특이성과 입체특이성이 결정된다. 현재 이러한 구조연구를 기반으로 사용목적에 따른 맞춤형 효소를 생산하기 위한 효소 개량연구가 활발히 진행되고 있다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 가톨릭대학교 교비연구비의 지원으로 이루어 졌음.

REFERENCES

- Aehle, W., G. Gerritse, and H.B.M. Lenting. 1995. Lipases with improved surfactant resistance. WO9530744.
- Batenburg, A.M., M.R. Egmond, L.G.J. Frenken, and C.T. Verrips. 1991. Enzymes and enzymatic detergent compositions. EP407225.
- Brady, L., A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huger-Jensen, and L. Norskov. 1990. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**: 767-770.
- Derewenda, Z.S., U. Derewenda, and G.G. Dodson. 1992. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase at 1.9 resolution. *J. Mol. Biol.* **227**: 818-839.
- Derewenda U., L. Swenson, R. Green, Y. Wei, G.G. Dodson, et al.. 1994. An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. *Nat. Struct. Biol.* **1**: 36-47.
- Derewenda, U., L. Swenson, Y.Y. Wei, R. Green, P.M. Kobos, et al.. 1994. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface-crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *J. Lipid Res.* **35**: 524-534.
- Dugi, K.A., H.L. Dichek, and S. Santamarina-Fojo. 1995. Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **270**: 25398-25401.
- Egmond, M.R., J. de Vlieg, H.M. Veheij, and G.H. de Haas. 1995. Strategies and design of mutations in lipases, in: F. X. Malcata (Ed.), Engineering of/with Lipases, NATO ASI Series, Series E: Applied Sciences, 317, pp. 193-202.
- Giuseppin, M.L.F., M.T.S. Lopes, R.J. Planta, J.M.A. Verbakel, and C.T. Verrips. 1991. Process for preparing a protein by a fungus transformed by multicopy integration of an expression vector. WO9100920.
- Gray, G.L., S.D. Scott, and A.J. Ayrookaran. 1995. Lipase from *Pseudomonas mendocina* having cutinase activity. US5389536.
- Grochulski, P., Y. Li, J.D. Schrag, F. Bouthillier, P. Smith, et al.. 1993. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **268**: 12843-12847.
- Grochulski, P., Y. Li, J.D. Schrag, and M. Cygler. 1994. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.* **3**: 82-91.
- Hirose, Y., K. Kariya, Y. Nakanishi, Y. Kurono, and K. Achiwa. 1995. Inversion of enantioselectivity in hydrolysis of 1,4-dihydropyridines by point mutation of lipase PS. *Tetrahedron Lett.* **36**: 1063-1066.
- Holmquist, M., I.G. Clausen, S.A. Patkar, A. Svendsen, and K. Hult. 1995. Probing the functional role of E87 and W89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic solvent. *J. Protein Chem.* **14**: 217-

- 224.
15. Holmquist, M., D.C. Tessier, and M. Cygler. 1997. Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II. *Biochemistry* **36**: 15019-15025.
 16. Jaeger, K.E., B.W. Dijkstra, and M.T. Reetz. 1999. Bacterial biocatalysis: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 315-351.
 17. Jaeger, K.E., S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel, and O. Misset. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 29-63.
 18. Jeong, S.T., H.K. Kim, S.J. Kim, S.W. Chi, J.G. Pan, T.K. Oh, and S.E. Ryu. 2002. Novel zinc-binding center and a temperature switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase. *J. Biol. Chem.* **277**: 17041-17047.
 19. Joerger, R.D. and M.J. Haas. 1994. Alteration of chain length selectivity of a *Rhizopus delemar* lipase through site-directed mutagenesis. *Lipids* **29**: 377-384.
 20. Kawasaki, K., H. Kondo, M. Suzuki, S. Ohgiya, and S. Tsuda. 2002. Alternate conformations observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase determined at 1.3 Å resolution. *Acta Crystallogr.* **D58**: 1168-1174.
 21. Kim, K.K., H.K. Song, D.H. Shin, K.Y. Hwang, and S.W. Suh. 1997. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* **5**: 173-185.
 22. Kim, K.K., H.K. Song, D.H. Shin, K.Y. Hwang, S. Choe, et al.. 1997. Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an α/β hydrolase with broad substrate specificity. *Structure* **5**: 1571-1584.
 23. Krebsfänger, N., F. Zocher, J. Altenbuchner, and U.T. Bornscheuer. 1998. Characterization and enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *Enzyme Microb. Technol.* **22**: 641-646.
 24. Lang, D.A. and B.W. Dijkstra. 1998. Structural investigations of the regio- and enantioselectivity of lipases. *Chem. Phys. Lipids* **93**: 115-122.
 25. Lang, D., B. Hofmann, L. Haalck, H.J. Hecht, F. Spener, et al.. 1996. Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 resolution. *J. Mol. Biol.* **259**: 704-717.
 26. Lang, D.A., M.L.M. Mannesse, G.H. de Haas, H.M. Verheij, and B.W. Dijkstra. 1998. Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur. J. Biochem.* **254**: 333-340.
 27. Langin, D., H. Laurell, L.S. Holst, P. Belfrage, and C. Holm. 1993. Gene organisation and primary structure of human hormone-sensitive lipase: possible significance of a sequence homology with a lipase from *Moraxella* TA144, an antarctic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4897-4901.
 28. Longhi, S. and C. Cambillau. 1999. Structure-activity of cutinase a small lipolytic enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**: 185-196.
 29. Loveless, B.J. and J.M.H. Saier. 1997. A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol. Membr. Biol.* **14**: 113-123.
 30. Lowe, M.E.. 1997. Site-specific mutagenesis of human pancreatic lipase. *Methods Enzymol.* **284**: 157-170.
 31. Mannesse, M.L.M., R.C. Cox, B.C. Koops, H.M. Verheij, G.H. de Haas, M.R. Egmond, H.T.W.M. Vanderhijden, and J. de Vlieg. 1995. Cutinase from *Fusarium solani pisi* hydrolyzing triglyceride analogs-effect of acyl-chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. *Biochemistry* **34**: 6400-6407.
 32. Martinez, C., P. de Geus, M. Lauwereys, M. Matthyssens, and C. Cambillau. 1992. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* **356**: 615-618.
 33. Nardini, M., D.A. Lang, K. Liebeton, K.E. Jaeger, and B.W. Dijkstra. 2000. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* **275**: 31219-31225.
 34. Noble, M.E.M., A. Cleasby, L.N. Johnson, M.R. Egmond, and L.G.J. Frenken. 1993. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* **331**: 123-128.
 35. Ollis, D.L., E. Shea, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, et al.. 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**: 197-211.
 36. Osterlund, T., J.A. Contreras, and C. Holm. 1997. Identification of essential aspartic acid and histidine residues of hormone-sensitive lipase: apparent residues of the catalytic triad. *FEBS Lett.* **403**: 259-262.
 37. Patkar, S.A., J. Vind, E. Kelstrup, M.W. Christensen, A. Svendsen, K. Borch, and O. Kirk. 1998. Effect of mutations in *Candida antarctica* B lipase. *Chem. Phys. Lipids* **93**: 95-101.
 38. Petersen, S.B., P.H. Jonson, P. Fojan, E.I. Petesen, M.T.N. Petersen, S. Hansen, R.J. Ishak, and E. Hough. 1998. Protein engineering the surface of enzymes. *J. Biotechnol.* **66**: 11-26.
 39. Poulouse, A.J. and S.A. Anderson. 1990. Enzymatic peracid bleaching system with modified enzyme. EP375102.
 40. Reetz, M.T. and K.E. Jaeger. 1999. Superior biocatalysts by directed evolution. *Top. Curr. Chem.* **200**: 31-57.
 41. Reetz, M.T., A. Zonta, Z.K. Schimossek, K. Liebeton, and K.E. Jaeger. 1997. Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution. *Angew. Chem. Ed. Engl.* **36**: 2830-2832.
 42. Schrag, J.D. and M. Cygler. 1997. Lipases and / hydrolase fold. *Methods Enzymol.* **1284**: 85-107.
 43. Schrag, J.D., Y. Li, M. Cygler, D. Lang, T. Burgdorf, et al.. 1997. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* **5**: 187-202.
 44. Schrag, J.D., Y. Li, S. Wu, and M. Cygler. 1991. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* **351**: 761-764.
 45. Schrag, J.D., T. Vernet, L. Laramée, D.Y. Thomas, A. Recktenwald, et al.. 1995. Redesigning the active site of *Geotrichum candidum* lipase. *Protein Eng.* **8**: 835-842.
 46. Scheib, H., J. Pleiss, P. Stadler, A. Kovac, A.P. Pothhoff, L.

- Haalck, F. Spener, F. Paltauf, and R.D. Schmid. Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triacylglycerols. *Protein Eng.* **11**: 675-682.
47. Schmidt-Dannert, C., M.L. Rúa, S. Wahl, and R.D. Schmid. 1997. *Bacillus thermocatenulatus* lipase: a thermoalkalophilic lipase with interesting properties. *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 178-182.
48. Simons, J.W.F.A., J.W.P. Boots, M.P. Kats, A.J. Slotboom, M.R. Egmond, and H.M. Verheij. 1997. Dessecting the catalytic mechanism of staphylococcal lipases: chain length selectivity, interfacial activation and cofactor dependence. *Biochemistry* **36**: 14539-14550.
49. Svendsen, A., I.G. Clausen, S.A. Patkar, and E. Gormsen. 1992. Lipase variants. WO9205249.
50. Svendsen, A., I.G. Clausen, S.A. Patkar, and E. Gormsen. 1993. protease-stable proteins. WO9311254.
51. Svendsen, A., I.G. Clausen, S.A. Patkar, and E. Gormsen. 1994. lipase variants. WO9425577.
52. Taipa, M.A., K. Liebeton, J.V. Costa, J.M.S. Cabral, and K.E. Jaeger. 1995. Lipase from *Chromobacterium viscosum*: biochemical characterization indicating homology to the lipase from *Pseudomonas glumae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1256**: 396-402.
53. Theil, F. 1995. Lipase-supported synthesis of biologically active compounds. *Chem. Rev.* **95**: 2203-2227.
54. Tyndall, J.D.A., S. Sinchaikul, L.A. Fothergill-Gilmore, P. Taylor, and M.D. Walkinshaw. 2002. Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *J. Mol. Biol.* **323**: 859-869.
55. Uppenberg, J., M.T. Hansen, S. Patkar, and T.A. Jones. 1994. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2**: 293-308.
56. Upton, C. and J.T. Buckley. 1995. A new family of lipolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 178-179.
57. Van der Laan, J.M., H.B.M. Lenting, L.J.S.M. Mulleners, and M.M.J. Cox. 1994. New lipase variants for use in detergent applications. WO9425578.
58. van Kampen, M.D., J.W.F.A. Simons, N. Dekker, M.R. Egmond, and H.M. Verheij. 1998. The phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase strongly depends on a single Ser to Val mutation. *Chem. Phys. Lipids* **93**: 39-45.
59. van Pouderoyen, G., T. Eggert, K.E. Jaeger, and B.W. Dijkstra. 2001. The crystal structure of *Bacillus Subtilis* lipase: a minimal / Hydrolase Fold Enzyme. *J. Mol. Biol.* **309**: 215-226.
60. Wei, Y., J.L. Schottel, U. Derewenda, L. Swenson, S. Patkar, and Z.S. Derewenda. 1995. A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nat. Struct. Biol.* **2**: 218-223.
61. Wei, Y., L. Swenson, C. Castro, U. Derewenda, W. Minor, et al.. 1998. Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 resolution. *Structure* **6**: 511-519.
62. Winkler, F.K., A. D'Arcy, and W. Hunziker. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**: 771-774.
63. Yoneda, T., Y. Miyota, K. Ohno, and J. Sasuga. 1995. Lipase gene and variant lipase. WO9514783.

(Received Aug. 4, 2003/Accepted Oct. 7, 2003)