

Acinetobacter sp. SY-01로부터 Enantioselective Lipase의 생산

박호일 · 신평균 · 박대원*
한국과학기술연구원 수질환경 및 복원연구센터

Production of Enantioselective Lipase from *Acinetobacter* sp. SY-01. Park, Ho Il, Pyong Kyun Shin, and Daewon Pak*. Water Environment & Remediation Research Center. Korea Institute of Science and Technology(KIST), Seoul 136-791, Korea - Lipase from *Acinetobacter* sp. SY-01 plays an important role enzyme that products chiral drug. We investigated optimum condition for mass production of *Acinetobacter* sp. SY-01 lipase. Addition of among the different oils to medium. olive oil was optimal for enzyme production. When 0.2% olive oil was added as a carbon source, the production of lipase was increased to a maximum. The optimum pH and temperature were pH 7 and 30°C. In the presence of Fe²⁺ and Ca²⁺, the lipase activity was dramatically enhanced by 280% and 160%, respectively. SY-01 lipase was stable in the most of the DMSO among organic solvents. The addition of triton-X 100 increased the SY-01 lipase by 100-fold. The optimum composition of medium for production of the enzyme was 0.8% yeast extract, 0.2% olive oil, 0.4% triton X-100 + 40% DMSO, 0.1% NH₄Cl, 0.4% K₂HPO₄, 3.9% NaH₂PO₄, 0.03% CaCl₂ · 2H₂O, 0.01% FeSO₄ · 7H₂O (pH 7.0).

Key words: *Acinetobacter* sp. SY-01, enantioselective lipase, itraconazole

Lipase는 지질분해효소로서 oil과 물사이에 작용하여 triglyceride를 fatty acid와 glyceride 또는 glycerol로 가수분해할 뿐만 아니라 ester 합성반응을 촉매하기도 하며[2], aqueous와 nonaqueous solvent system 모두에서 활성을 나타내고 있다[18]. 미생물 기원의 lipase로는 *Humicola* spp.[9], *Pseudomonas aeruginosa*[5], *Aspergillus*[7], *Fusarium* [10], *Penicillium* spp.[12] 등에서 보고 되고 있다.

이들 lipase는 유제품의 방향 부여 목적으로도 사용되며, 지방산 제조나 세제 제조 등 산업적 목적이나 소화제 등의 학적으로도 이용되고 있다[1,3].

특히 20세기 들어서는 lipase 효소를 이용한 chiral drugs의 생산이 증가하고 있어 lipase 효소의 주요성이 증가하고 있다. Chiral 약품의 두 enantiomer는 생체내에서 각기 다른 작용을 하게 된다[6]. 즉, 두 형태의 enantiomer로 이루어진 racemate로 약이 투여될 경우 racemate는 각기 다른 생화학적 대사경로와 다른 대사반응속도를 가지게 되는 바, 한 enantiomer는 약리활성을 보이는 반면 반대의 enantiomer는 전혀 활성이 없거나 오히려 독성을 보일 수도 있다. 이런 생물학적인 활성의 차이가 인식되면서 FDA는 chirality가 생물학적 활성에 미치는 특성에 따라 chiral 약품의 판매 형태를 결정하겠다는 정책을 발표하였다[11]. Enantiomer의 화학

적 합성은 매우 어렵고 많은 단계가 필요하므로 새로운 합성방법인 효소를 이용한 합성방법이 모색되고 있다[15]. 이러한 합성방법에 이용되는 효소로는 esterase와 lipase가 사용된다[4].

따라서 본 연구에서는 소염진통제로 쓰이는 azole계 의약품 중간체인 두 enantiomer를 가진 racemate에 대해 enantioselectivity를 가진 *Acinetobacter* sp. SY-01 lipase 효소 생산을 증가시키기 위해 여러 가지 최적 조건을 선정하는 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험 균주

본 실험에 사용된 공시균주는 우리나라 산업공단지역 하수의 토양이나 sludge에서 채취한 미생물중에서 rhodamine B agar plate에 접종하여 배양한 후 자외선을 조사하여 오랜 지색 형광을 나타내는 균주를 1차 선별하고 azole계 화합물인 itraconazole에 대해 입체선택성을 보이는 균주를 2차 선별하였다. 이들중에서 높은 입체선택성을 가지는 균주인 *Acinetobacter* sp. SY-01를 선택하였다.

균주 동정

생리학적 특성은 미생물 동정 시스템(biolog system, Biolog사, 프랑스)인 GN2 microplate와 그람음성세균 동정 카드(GNI+, Biomerieux사, 프랑스) 이용하였고, 생화학적 특

*Corresponding author
Tel. 02-958-5835, Fax. 02-958-5839
E-mail: Daewon@kist.re.kr

성은 분리균주의 유전자 연구를 위해 lipase 염기서열을 이용하여 균주를 동정하였다.

기질

본 실험에 사용된 racemate는 항진균제 제조에 쓰이는 원료의 중간체인 itraconazole(Cis-2-bromomethyl-2-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-dioxolane-4-methyl acetate)을 사용하였다.

효소 생산

효소생산을 위해 *Acinetobacter* sp. SY-01을 LB배지에 30°C에서, 200 rpm으로 24시간 배양한 후 이 배양액을 최소 배지(NH₄Cl 1 g/l, K₂HPO₄ 4.35 g/l, NaH₂PO₄ 3.9 g/l, CaCl₂·2H₂O 0.03 g/l, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/l, MnCl₄·4H₂O 0.01 g/l, CoCl₂·2H₂O 0.001 g/l, NaMoO₄·2H₂O 0.001 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.48 g/l)와 yeast extract 8 g/l, olive oil 2 g/l이 함유된 배지에 2% 농도로 첨가한 후 30°C에서 200 rpm으로 12시간 배양한 후 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 취하였다.

Lipase activity 측정

Lipase activity는 Tietic and Fiereck의 방법[14]을 기초로 한 Sigma Diagnostics을 변형한 sigma lipase substrate (olive oil emulsion) 1 ml, 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 1 ml, 조효소액 1 ml을 혼합하여 50°C에서 2시간 반응한 후 95% 에탄올 3 ml을 넣어 반응 정지시켰다. 반응시 생성된 유리 지방산은 0.05 N NaOH 용액을 사용하여 적정하였고 지시약으로는 0.9% thymol phthalein을 사용하였다. 효소 1 unit은 1분 동안에 1 mol의 유리지방산을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

기질 입체 선택성 조사

효소용액에 의해 가수분해된 라세믹 기질에 대한 입체선택성을 조사하기 위하여 HPLC(영린기기(주))를 사용하여 분석을 시행하였다. column은 chiralcel OD(Chiral Technologies, Exton, PA, USA.), column 크기는 4.6 mm×250 mm, 이동상은 5% isopropyl alcohol을 함유한 *n*-hexane을 사용하였고, flow rate는 1 ml/min로 하였다. column pressure는 500 bar, column temperature 25°C, detection은 UV 230 nm로 하였다. 입체선택성의 정도를 나타내는 지표인 conversion (%), enantiomeric excess(ee) 값은 다음과 같이 계산하였다.

분할(rsolution)공정에서 두 가지 반응을 다음과 같이 묘사할 수 있다.



여기에서 A와 B는 라세믹 기질이고, C와 D는 라세믹 생성물이다. 이때, 전환율(Conversion, c)은 $([C] + [D])/([A]$

+ [B] + [C] + [D])로 나타낼수 있고, B가 A보다 반응속도가 느리다면, 기질에 대한 enantiomeric excess(ees)은 $([B] - [A])/([A] + [B])$ 로 나타낼수 있고, 생성물에 대한 enantiomeric excess(eep)는 $([C] - [D])/([C] + [D])$ 로 나타낼수 있다[16].

$$c = \frac{([C] + [D])}{([A] + [B] + [C] + [D])}$$

$$ee_s = \frac{([B] - [A])}{([A] + [B])}$$

$$ee_p = \frac{([C] - [D])}{([C] + [D])}$$

결과 및 고찰

분리 균주의 기질 입체 선택성 조사

산업공단지역 하수의 토양이나 sludge 분리한 미생물중에서 rhodamine B agar plate에서 자외선 조사시 오렌지색 형광을 나타내는 균주 100여종 분리한 다음 이들 균주를 가지고 기질로 사용된 itraconazole에 대한 입체선택성을 HPLC를 이용하여 분석한 다음 각 균주의 전환율과 기질 및 산물에 대한 입체선택성을 확인하였다(Table 1). 100여종의 균주들 중에서 많은 수의 균들은 입체선택성이 없거나 낮았으나 10여종 정도가 기질 또는 산물에 대한 입체선택성을 보였다. 공시균주는 산물에 대해서는 입체선택성이 낮았지만 기질에 대해서는 높은 입체선택성을 나타냈다(Fig. 1).

분리균주의 동정

형태 및 생리학적 특성. 분리균주 SY-01의 생리학적 특성을 확인하기 위해 미생물 동정 시스템(biolog system)인 GN2 microplate와 그람음성세균 동정 카드(GNI⁺)를 이용하였다. 분리 균주 SY-01의 형태는 원형(coccus)이며 그람음성균이다. 또한 oxidase 활성 시험결과 양성반응을 나타냈다

Table 1. Isolated strains producing lipase which enantioselectively itraconazole(Cis-2-bromomethyl-2-(2,4-dichlorophenyl)-13-dioxolane-4-methyl acetate).

Strains	Conversion (%)	ee _s (%)	ee _p (%)
<i>A. sp</i> SY-01	70.4	81.2	45.3
2	11.73	1.77	38.29
3	41.63	6.63	4.58
4	69.11	39.12	21.02
5	59.92	54.63	43.75
6	17.30	5.39	50.61
7	13.89	3.32	51.41
8	12.64	2.53	21.58
9	41.19	37.41	61.10
10	78.07	20.19	1.57

(ee_s=enantiomeric excess for substrate, eep=enantiomeric excess for product).

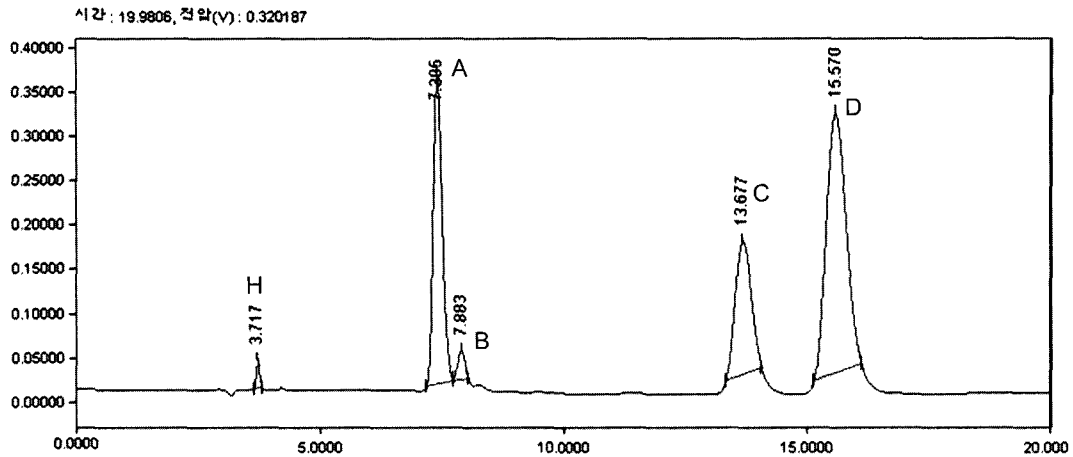
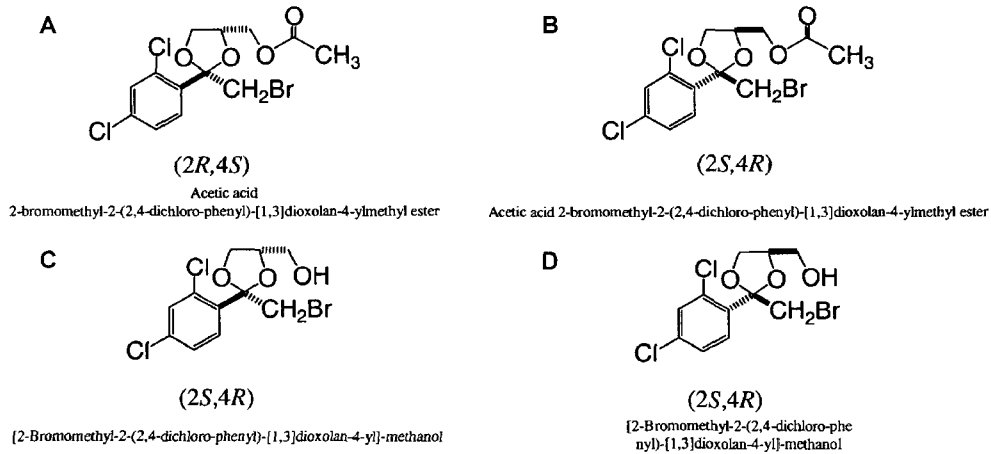


Fig. 1. HPLC chromatograms of substrate and product after resolution by enzymatic hydrolysis reaction (H: *n*-hexane peak, A, B: substrates peak, C, D: product peak). Enantiomeric excess for substrate (ee_s) value of *Acinetobacter* sp. SY-01 is 81.2%. A diagram of substrate: (A, B) and products (C, D).



(data not shown).

생화학적 특성. 분리균주는 lipase 구조 및 염기서열을 확인하기 위해 lipase 유전자를 sequencing하여 단백질 및 아미노산 서열을 확인하고 Genebank accession에 의해 동정하였다[8]

효소생산을 위한 탄소원의 영향

효소생산에 최적조건을 선정하기 위해 먼저 탄소원의 영향을 확인해 보았다. 탄소원으로는 olive oil, sesame oil, peanut oil, oleic acid, lard oil, cotton seed oil, fish oil, linseed oil, safflower seed oil, soybean oil 등의 각종 천연 오일을 최종 농도가 0.2%되게 첨가한 후 30°C에서 200 rpm으로 12시간 반응한 후 조효소액을 취하여 lipase activity를 측정하였다(Fig. 2). Lipase activity 측정 결과 olive oil, sesame oil, linseed oil, soybean oil에서 좋은 결과를 보였다. 반면 peanut oil, oleic acid, lard oil, cotton seed oil에서 낮은 activity를 보였고, fish oil에서는 activity를 전혀 보이지 않았다. 활성이 가장 좋게 나타난 olive oil을 이용하여 농도에

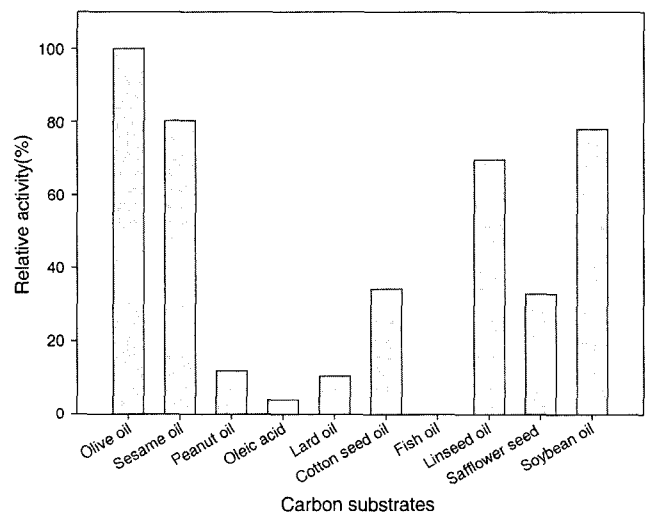


Fig. 2. Effect of carbon substrates on lipase production. The basal medium contained yeast extract (0.8%). Culture were grown at 30°C for 12h in the presence of each of the carbon substrates. Enzyme reaction was carried out at 50°C for 2h in 0.1 M trizma buffer (pH 7.0).

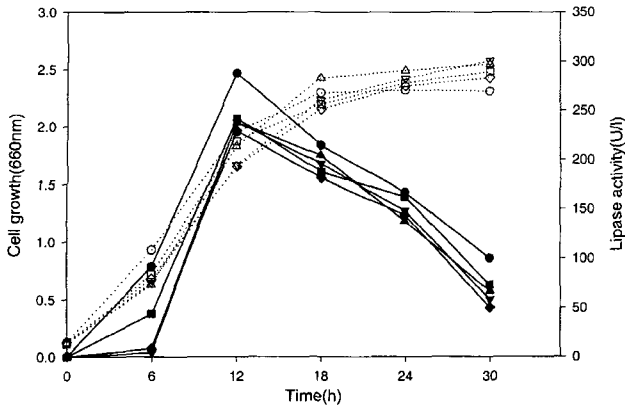


Fig. 3. Effect of various concentration of olive oil on lipase production. The basal medium contained yeast extract (0.8%). Culture were grown at 30°C in the presence of various concentration of olive oil. Enzyme reaction was carried out at 50°C for 2h in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0). Cell growth (○: add 0.2% olive oil, □: add 0.4% olive oil, △: add 0.6% olive oil, ▽: add 0.8% olive oil, ◇: add 1.0% olive oil), Lipase activity (●: add 0.2% olive oil, ■: add 0.2% olive oil, ▲: add 0.2% olive oil, ▼: add 0.2% olive oil, ◆: add 0.2% olive oil).

다른 lipase activity를 시간별로 확인하였다(Fig. 3). Olive oil은 최소배지에 최종 농도 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0%(v/v)로 6시간 단위로 활성을 측정하였다. Lipase activity는 olive oil 0.2%가 12시간에서 가장 좋은 활성을 나타내었으며 그 후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 탄소원으로는 0.2% olive oil을 첨가하여 12시간 배양하는 것이 높은 효소생산량을 보였다.

최적 온도 및 pH

본 효소 생산의 최적 온도를 측정하기 위해 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C에서 실험해 본 결과 Fig. 4과 같이 나타

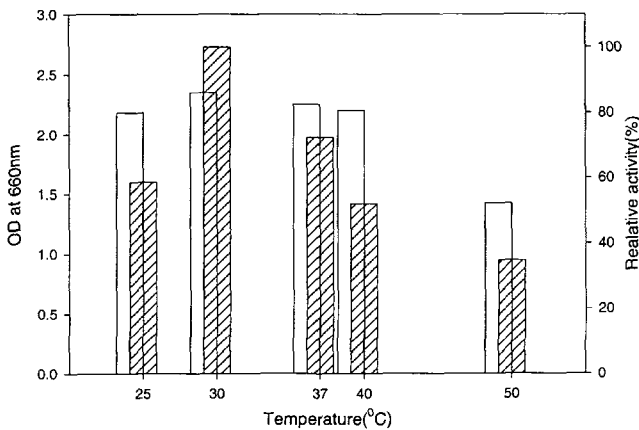


Fig. 4. Effect of temperature on lipase production. The basal medium contained yeast extract (0.8%). Culture were grown at pH 7.0 in the presence of concentration of olive oil. Enzyme reaction was carried out at 50°C for 2h in 0.1 M trizma buffer (pH 7.0). □: Cell growth, ▨: Enzyme activity.

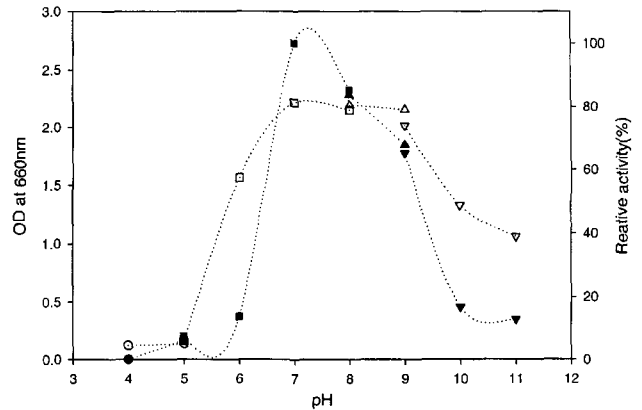


Fig. 5. Effect of pH on lipase production. Enzyme reaction was carried out at 50°C for 2h in 0.1M citrate-phosphate buffer (pH 4-5), 0.1M phosphate buffer (pH 5-8), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8-9), and 0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 9-11). ○, ●: citrate-phosphate buffer, □, ■: phosphate buffer, △, ▲: Tris-HCl buffer, ▽, ▼: glycine-NaOH buffer.

났다. 미생물 생장에 있어서는 25°C, 30°C, 37°C, 40°C에서 큰 차이를 보이지 않았지만 효소 생산에 있어서는 30°C에서 가장 좋았다. 최적 pH를 확인하기 위해 pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10의 다양한 범위에서 서로 다른 완충용액을 이용하여 효소 활성을 측정하였다. pH 4-5는 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 5-8은 0.1M phosphate buffer, pH 8-9는 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 9-11은 0.1 M glycine-NaOH buffer를 이용하였다. Fig. 5에 나타난 결과와 같이 미생물 생장에 있어서는 pH 7-9 범위에서 큰 차이가 없었으며 낮은 pH에서는 미생물 생장이 좋지 않았다. 한편 효소 생산에 있어서는 pH 7-9 범위에서 좋은 효과를 나타냈으며 pH 7.0에서 가장 좋은 효소 생산을 나타내었다. 따라서 효소 생산에 있어 안정적인 pH 범위는 pH 7-9로 나타났다.

효소 생산에 있어서의 금속이온의 효과

Lipase를 생산함에 있어 금속이온이 미치는 영향을 알아보기 위해 2 mM의 금속이온을 배지에 첨가하여 30°C에서 12시간 배양한 후 조효소액 1 ml을 취하여 lipase activity를 측정하였다. 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 금속이온 중 Fe²⁺와 Ca²⁺가 lipase activity에 좋은 효과를 나타내어 효소 생산에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 효소 생산에 있어 특히 Fe²⁺은 금속이온을 넣지 않은 대조군에 비해 약 3배 정도의 높은 활성을 보였다. 반면 Co²⁺, Ba²⁺, Ni²⁺, K⁺, Na⁺ 등은 효소 생산을 저해시키는 것으로 나타났다.

유기용매가 효소 생산에 미치는 영향

Hexane, toluene, benzene, nonane, 1-heptanol, dodecane, octane, ethanol, isopropanol, p-xylene, dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone 등의 유기용매를 배지의 40%(v/v)농도로 첨가한 후에 30°C에서 12시간 배양한 후 조효소액 1 ml을

Table 2. Effect of metal ions on lipase production.

Metal ion	Relative activity (%)	Metal ion	Relative activity (%)
None	100	Ag ²⁺	33.4
Fe ²⁺	280	Cu ²⁺	103.4
Ca ²⁺	160	Ba ²⁺	16.7
Co ²⁺	16.7	Ni ²⁺	26.7
Mn ²⁺	60.0	K ⁺	56.7
Mg ²⁺	96.7	Na ⁺	46.7

The basal medium contained yeast extract 8 g/l, NH₄Cl 1 g/l, K₂HPO₄ 4.35 g/l, NaH₂PO₄ 3.9 g/l.

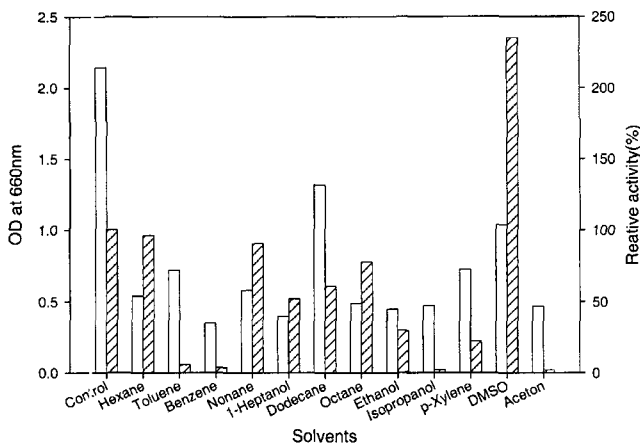


Fig. 6. Effect of different solvents on lipase production. Culture were grown containing various organic solvents (40%) at 30°C for 12h. Enzyme reaction was carried out at 50°C for 2h in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0).

취하여 활성을 측정된 결과를 Fig. 6과 같이 나타내었다. 미생물 생장에 있어서는 유기용매를 넣지 않은 control에 비해 낮은 생장을 보였다. 효소 생산에 있어서는 Hexane, nonane, octane 등은 효소 활성에 영향을 거의 미치지 않았으며 toluene, benzene, ethanol, isopropanol, p-xylene, acetone 은 효소 활성을 저해시켰다. 그러나 DMSO는 유기용매를 넣지 않은 것보다 약 2.5배 정도의 효소 활성을 나타냈다. 그래서 DMSO 농도가 효소 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 농도를 10%-100%(v/v)로 변화시켜 확인해 보았다(Fig. 7). DMSO의 농도는 40%(v/v)일 때 가장 좋은 활성을 나타냈으며 농도가 증가할수록 활성이 점차 감소함을 볼 수 있었다. 그러나 DMSO를 넣지 않은 대조군에 비해서는 전체 농도에서 높은 활성을 나타냈다. DMSO가 효소를 직접적으로 자극시키며 기질의 용해도를 증가시키기 때문에 효소 활성이 증가된 것으로 나타났다[17].

계면활성제 Triton X-100가 효소 생산에 미치는 효과

Tween 80, tween 20, triton X-100과 같은 여러 가지 계면활성제를 이용하여 lipase 효소 활성을 측정했을 때 triton

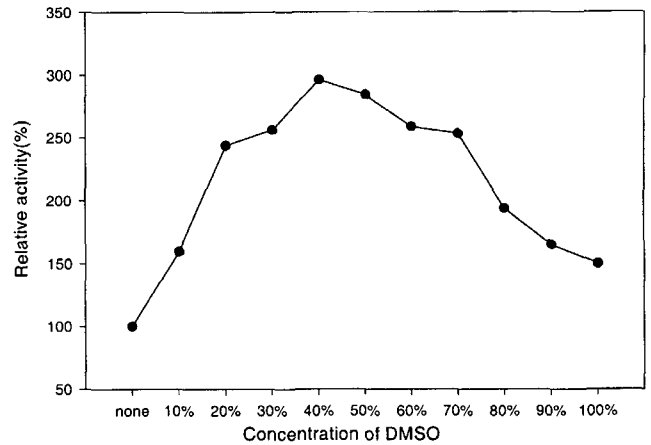


Fig. 7. Effect of various concentration DMSO on lipase production. Culture were grown at 30°C for 12h. Enzyme reaction was carried out at 50°C for 2h in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0).

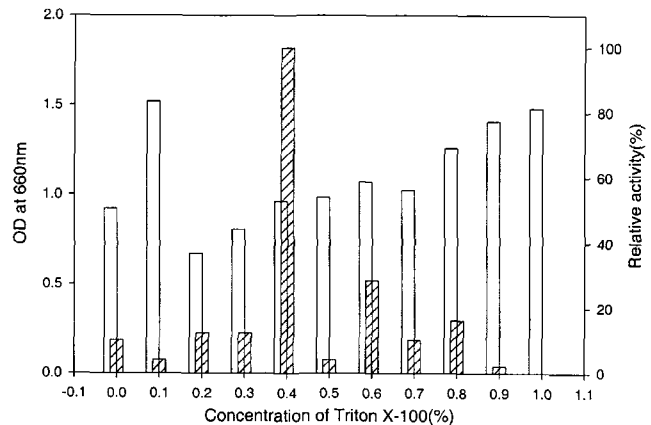


Fig. 8. Effect of various concentration of triton X-100 on lipase production. Culture were grown at 30°C for 12h. Enzyme reaction was carried out at 50°C for 2h in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0).

X-100이 효소 생산에 있어 좋은 효과를 나타냈다(data not shown). 또한 triton X-100의 농도를 0%-1.0%(v/v)까지 다양하게 변화시켜 효소 생산 확인하였다. Triton X-100을 첨가한 후 6시간, 9시간, 12시간 반응 한 후 조효소액 1ml을 취하여 효소 반응을 실시한 결과 0.4%(v/v) triton X-100이 6시간 배양했을 때 높은 활성을 보였다(Fig. 8). Triton X-100에 의한 효소 활성 증가는 plasma membrane 투과성을 변형시켜 세포로부터 compounds의 흡착을 촉진시키기 때문인 것 같다[13].

요 약

Acinetobacter sp. SY-01가 생산하는 lipase는 소염진통제로 쓰이는azole계 의약품 중간체인 두 enantiomer를 가진 racemate에 대해 enantioselectivity를 가지는 효소로써 chiral

drug를 생산하는데 있어 중요한 역할을 수행한다. *Acinetobacter* sp. SY-01 lipase 효소의 다량 생산을 위한 여러 가지 최적 조건을 조사하였다. 탄소원으로는 여러 가지 천연 오일을 이용하여 실험한 결과 0.2% olive oil이 가장 좋았으며, 최적 온도와 pH는 30°C와 pH 7이었다. 또한 금속이온과 유기용매 안정성에 있어서는 Fe^{2+} , Ca^{2+} 과 DMSO가 좋은 효과를 나타냈다. 특히 DMSO는 유기용매가 첨가되지 않았을 때보다 약 2.5배 높은 효소 활성을 나타내었다. 계면활성제 이용에 있어서는 triton X-100을 이용했을 때 좋은 효과가 나타났다. *Acinetobacter* sp. SY-01가 생산하는 lipase 효소의 최적 배지 조성은 0.8% yeast extract, 0.2% olive oil, 0.4% triton X-100, 40% DMSO, 0.1% NH_4Cl , 0.4% K_2HPO_4 , 3.9% NaH_2PO_4 , 0.03% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.01% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (pH 7.0)이다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 중점국가연구개발사업 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Andree, H., W. R. Muller, and R. D. Schmid. 1980. Lipases as detergent components. *J. Appl. Biochem.* **2**: 218-229.
- Brzozowski, A. M., U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, I. B. Huge-Jensen, S. A. Partkar, and L. Thim. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **354**: 491-494.
- Bjorkling, F., S. E. Godtfredsen, and O. Kirk. 1991. The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* **9**: 360-363.
- Chang, H. N., Y. K. Chang, and S. Y. Lee. 1995. Production of chiral drugs using biocatalyst. *Recent Advances in Bioprocess Engineering* **3**: 115-127.
- Chartrain, M., L. Katz., C. Marcin, M. Thien, S. Smith, E. Fisher, K. Goklne, P. Salmon, T. Brix, K. Price, and R. Greasham. 1993. Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 575-580.
- Federsel, H. J. 1993. Drug chirality-scale-up, manufacturing, and control. *CHEMTECH.* **23**: 23-34.
- Fukumoto, J., M. Iwai, and Y. Tsujosaka. 1963. Studies in lipase. I. Purification and crystallization of a lipase secreted by *Aspergillus niger*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **9**: 353-361.
- Han, S. J., J. H. Back, M. Y. Yoon, P. K. Shin, C. S. Cheong, M. H. Sunge, S. P. Hong, I. Y. Chung, and Y. S. Han. 2003. Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* species SY-01. *Biochimie (in press)*.
- Huge-Jensen, I. B., E. Gormsen. 1989. Enzymatic detergent additive. *U. S. patent* 4, 810, 414.
- Iwai, M., S. Okumura, and Y. Tsujisaka. 1975. The comparison of properties of two lipase from *Penicillium cyclopium*. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 1063-1070.
- Ojima, I., N. Clos, and C. Bastos. 1989. Recent advances in catalytic asymmetric reactions promoted by transition metal complexes. *Tetrahedron.* **45**: 6901-6939.
- Shimada, Y., C. Koga, A. Sugihara, T. Nagao, N. Takada, S. Tsunasawa, and Y. Tominaga. 1993. Purification and crystallization of a novel solventtolerant lipase from *Fusarium heterosprum*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 349-352.
- Shuen, F. L., C. M. Chiou, and Y. C. Tsai. 1995. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotech. letters.* **17**: 959-962.
- Tietz, N. W., E. A. Fioreck. 1966. A specific method for serum lipase determination. *Clin. Chim. Acta.* **13**: 352-358.
- Wong, C. H. 1989. Enzymatic catalysts in organic synthesis. *Science* **244**: 1145-1152.
- Yoon, M. Y. 2000. A study on chiral resolution of antifungal drug intermediate using *Burkholderia cocovenenans* SY-01 lipase. a doctor's thesis. Dongguk university.
- Yossef, S., N. D. Mishne. 1991. Production, purification, and properties of lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS-7) capable of growing in water-restricted environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 174-180.
- Zaks, A., A. M. Klibanow. 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 3192-3196.

(Received Nov. 18, 2002/Accepted May 15, 2003)