

好酸性細菌 *Acidocella facilis* 由来 菌体外酸性エステラーゼ遺伝子のクローニング

高橋 竜也・田中 登・田村 隆・向井 千佳
磯部 公安^{a)}・若尾 紀夫^{a)}・田中 英彦・稲垣 賢二
(生物資源化学講座)

Cloning of the Extracellular Acid Esterase Gene from Acidophilic Bacterium, *Acidocella facilis*

Tatsuya Takahashi, Noboru Tanaka, Takashi Tamura,
Chika Mukai, Kimiyasu Isobe^{a)}, Norio Wakao^{a)},
Hidehiko Tanaka and Kenji Inagaki
(Department of Bioresources Chemistry)

An acidophilic heterotrophic bacterium, *Acidocella facilis* sp. AIU409 produces an extracellular acid esterase when grown in a medium containing sorbitan mono ester, Tween 80. The *estA* gene encoding for the acid esterase was isolated from the genomic library of *A. facilis* AIU409, cloned into *Escherichia coli* MV1184, and the nucleotide sequence of the gene was determined. The structural gene of *estA* was found to be 1881bp. The open reading frame of *estA* encodes 627 amino acid residues (calculated molecular mass, 64,140 daltons). A rho-independent terminator was present just downstream of the termination codon, TGA. The deduced N-terminal amino acid showed that the precursor of the acid esterase had a signal peptide composed of 23 amino acids and a consensus sequence of lipase, G-X-S-X-S. The molecular mass excluding the signal peptide calculated from the deduced amino acid sequence of the acid esterase is 61,846. This is lower than the molecular mass, 64 kDa estimated by gel electrophoresis. The predicted amino acid sequence of the acid esterase has high similarity to the acyltransferase from *Aeromonas hydrophila* and the lipase from *Xenorhabdus luminescens*.

Key words : acid esterase, extracellular enzyme, *Acidocella facilis*, Acidophiles, signal peptide

緒 論

好酸性細菌は、生育至適 pH 3.0-6.5の酸性条件下を好んで生育する極限環境微生物である。当研究室で研究されている *Acidiphilium* 属細菌や、*Acidocella* 属細菌は、好酸性細菌の代表的な菌である。1981年 Harrison¹⁾は、酸性鉱山排水から分離した好酸性従属栄養細菌について、新たに *Acidiphilium* 属を提唱し、*A. cryptum* の1属1種を報告した。Wichlacz²⁾

らも酸性鉱山排水から多数の好酸性従属栄養細菌を分離し、有機物の資化性、遺伝的、形態的特徴からこれらを3群に分け、そのうち3種を新種とし、*A. angustum*, *A. facilis*, *A. rubrum* として報告した。また、Lobosらも同じ頃、数年にわたって独立栄養

Received October 1, 2001

a) 岩手大学農学部

(Faculty of Agriculture, Iwate University)

的に生育している鉄酸化細菌 *Thiobacillus ferrooxidans*³⁾の培養液から好酸性従属栄養細菌を分離し、*A. organovorum* として報告している。それ以降、1995年まで *Acidiphilium* 属は、*A. aminolytica*, *A. angustum*, *A. cryptum*, *A. facilis*, *A. multivorum*, *A. organovorum*, *A. rubrum* の7種で構成されていた。しかし、1995年の Kishimoto らの提案により、これまで *Acidiphilium* 属細菌として一括して分類されてきた *Acidiphilium aminolytica*, *Acidiphilium facilis* 2種を新属の *Acidocella* 属として分類することとなった⁴⁾。

エステラーゼ(EC 3.1.1.1)は、脂肪酸エステルの加水分解を触媒する酵素である。同様の反応を触媒する酵素によく知られているリパーゼ(C 3.1.1.3)がある。その応用としては、食品における新たな香料の開発、もしくは有機溶媒中での酵素触媒反応を利用したエステル合成などが考えられる。エステラーゼについては Tween を基質として用いたスクリーニングが行われており、いくつかの微生物から活性が報告されている。しかしながら Tween 加水分解エステラーゼの詳細な研究報告例は比較的少ない^{5,6,7)}。我々は、好酸性細菌の生理、生化学的な研究を行っている過程で *Acidocella facilis* の生産する菌体外酸性エステラーゼの存在を見出し、諸性質を明らかにした(Table 1)^{8,9)}。本酵素は *Acidocella facilis* の菌体外に大量に分泌される酵素であり、同じ好酸性細菌である *Acidiphilium* 属細菌には活性が検出されないことから、これら2属の分類の指標となり得ることも明らかとなっている (Table 2)。本酵素は、培地に添加したソルビタンモノエステル

Tween 80により誘導される酵素であり、同じエステラーゼであるリパーゼとは異なりトリグリセリドを加水分解することはできない。このエステラーゼは、菌対外に分泌される菌対外酵素である。また、*Pseudomonas aeruginosa*¹⁰⁾や *Mycobacterium smeg-*

Table 2 Properties of extracellular esterase from *Acidocella facilis* AIU409

Molecular weight		
SDS-PAGE		64,000
pI		5.25
Optimum pH (pH, 37 °C)		
<i>p</i> -NP laurate		5.0
Optimum temp. (°C, pH 4.0)		
<i>p</i> -NP laurate		70
pH-Stability (pH, 90%)		
(50 °C, 2 days)		3.0-6.5
Thermostability (°C)		
(pH 4.0, 60 min.)		80
Substrate specificity		
<i>p</i> -NP ester	C8 : 0-C18 : 0 >> C2 : 0-C6 : 0	
	Relative act. (%)	Km (mM)
C 2 : 0-C 6 : 0	0-9	-
C 8 : 0	47	1.32
C10 : 0	100	1.51
C12 : 0	58	1.55
C14 : 0	58	1.59
C16 : 0	64	1.30
C18 : 0	36	1.45
Sorbitan ester		Tween > Span
Triglyceride		No hydrolysis
Inhibitor		PMSF, SDS, Monohydric alcohol

Table 1 Distribution of esterase activity in the genus *Acidocella* & *Acidiphilium*

Strain		Culture broth		Esterase activity	
		pH	Growth (OD ₆₆₀)	Supernatant (U/100ml broth)	Cells (U/cell of 100ml broth)
<i>Acidocella facilis</i>	ATCC35904	2.8	2.5	64.2	47.0
"	AIU409	2.8	2.5	24.7	48.5
" <i>aminolytica</i>	JCM8796	3.3	1.5	< 1	3.8
<i>Acidiphilium cryptum</i>	ATCC43141	3.2	2.3	< 1	< 1
" <i>organovorum</i>	DSM2389	4.0	1.4	< 1	< 1
" <i>multivorum</i>	JCM8867	3.7	1.9	< 1	< 1
" <i>angustum</i>	ATCC35903	3.9	<0.5	< 1	< 1
" <i>rubrum</i>	ATCC34905	3.9	<0.5	< 1	< 1

*matris*¹¹⁾のエステラーゼの至適 pH が8.3および8.5であるのに対して、*Acidocella facilis* の本酵素の至適 pH は5.0であり、更に pH 安定性も3.0-6.5と酸性側に偏っており、好酸性細菌の特徴を顕著に示すものである。また至適温度は70°Cであり、80°Cで1時間の熱処理後も90%近い残存活性を示し、常温菌由来の酵素としては、極めて安定な酵素である。これらの諸性質から、将来的にその応用性が広がるものと期待される。本研究の目的は、本酵素の遺伝子レベルからの解明、大量発現系の構築、さらに *Acidocella* 属の菌対外酵素分泌機構の解明にある。

材料と方法

使用菌株、プラスミド、及び培地

DNA 供与菌として *Acidocella facilis* AIU409を、また宿主菌として *Escherichia coli* JM109及び MV1184 を使用した。クローニングベクターには、pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 (日本ジーン) を用いた。*Acidocella* 属細菌用の HGYE 培地 { $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, K_2SO_4 0.01%, K_2HPO_4 0.01%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, Trypticase Soy Broth 0.1%, glucose 0.4%, Yeast Extract 0.05%, pH 3.5} を使用し、30°Cで培養を行った。大腸菌の培養は LB 培地を使用し、37°Cで好氣的に行った。大腸菌の培地には必要に応じてアンピシリン (50 $\mu\text{g}/\ell$) を添加した。

エステラーゼ遺伝子のクローニング

Acidocella facilis AIU409の染色体 DNA を単離精製し、現在までに明らかになっている N 末端アミノ酸配列をもとにプライマーを作成し、PCR 法により目的遺伝子を増幅した。さらに、得られた塩基配列をもとに、カセット PCR 法を用いて、エステラーゼ遺伝子を増幅した。これにより得られた *EcoRI* カセットの1.4 kb 断片を [α -³²P] dCTP で標識したものをプローブとして使用し、コロニーハイブリダイゼーション法により、目的の遺伝子をもつ組換え大腸菌のスクリーニングを行った。

酵素活性測定法

エステラーゼ遺伝子を保有する大腸菌の培養には、LB 培地 (pH 5.0) を使い、1晩培養後、必要に応じて0.3 mM IPTG を添加後2~12時間誘導をかけた。また、コントロールとして用いた *A. facilis* AIU409 株の培養には HGYE 液体培地、HGYE 液体培地+

1% Tween80 を使い、10日間培養した。酵素液 (菌体破碎液または培養液上清) 0.1 ml に対し、2.78 mM *p*-nitrophenyllaurate (*p*-NPL) と2.2% Triton X-100 を含む50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) を0.9 ml 添加し、37°Cで30分間インキュベートした。0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) を0.5 ml 添加し、さらにアセトン 2 ml を添加して反応を停止した。この反応液を遠心分離し (3,000 rpm, 5 min 4°C), 410 nm での吸光度を測定した。

酵素 1 Unit は、37°Cで1分間に *p*-NPL から 1 μmol の *p*-nitrophenol を与える酵素量と定義した。

結果と考察

エステラーゼ遺伝子のクローニング

既に判明している本酵素の N 末端アミノ酸配列 {GNLYVFGDSLSDDG NLYKLGL-PP} をもとにプライマーをデザインした。センスプライマーとして22 mer, 64通り {5'-cgggatccgg (tgca) aa (tc) ct (tgac) ta (tc) gt-3'}, アンチセンスプライマーとしては21 mer, 128通り {5'-ggaattcgg (gc) gg (tgac) gt-3'}。それぞれのプライマーの5'末端部分には制限酵素サイトを導入した。これらのプライマーを作成後、*A. facilis* AIU409株のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、86 bp の DNA 断片を得ることができた。86 bp はプライマーをデザインしたときに予想された断片の大きさと完全に一致した。また、この配列から予想されるアミノ酸配列は本酵素の N 末端配列と完全に一致した。

得られた DNA 断片をプローブとして用いて、*A. facilis* AIU409株のゲノム DNA のサザンブロット解析を行った。その結果、*EcoRI* で切断した3.5 kb 断片、*PstI* で切断した4.4 kb 断片にこのプローブが強くハイブリダイズすることが判明した (Data not Shown)。次に、この得られた配列の周辺領域をカセット PCR 法を用いて解析した。Fig. 1 の配列中に矢印で示したプライマーを用いて、上流域方向に約400 bp、下流域方向に1.4 kb クローニングすることに成功した。

それにより得られた *EcoRI* カセットの1.4 kb 断片をプローブとして、*Acidocella facilis* のゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーション解析を行った。すべてのレーンにシグナルが確認され、目的遺伝子をすべて含まれると考えられる *BamHI* 切断の6 kb 断

片を本酵素遺伝子のクローニングターゲットとした。(Fig. 2)

ゲノム DNA の *Bam*HI 切断の 6 kb 断片を電気泳動後のゲルより回収し、ベクター pUC119にライゲーション、*E. coli* MV1184を形質転換させた。このプラスミドを pAET 3 とし、カラーセレクション

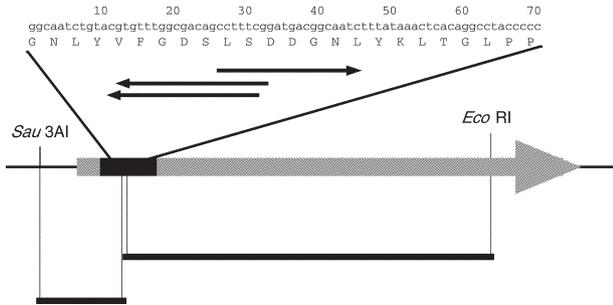


Fig. 1 Cloning strategy of acid esterase gene (*estA*) of *A. facilis* AIU409.

The bold arrows indicate the position and direction of transcription of gene. The nucleotide sequence and the amino acid sequence indicated with bold line is N-terminal sequence of the esterase. The short arrows indicate the position and direction of the PCR primers

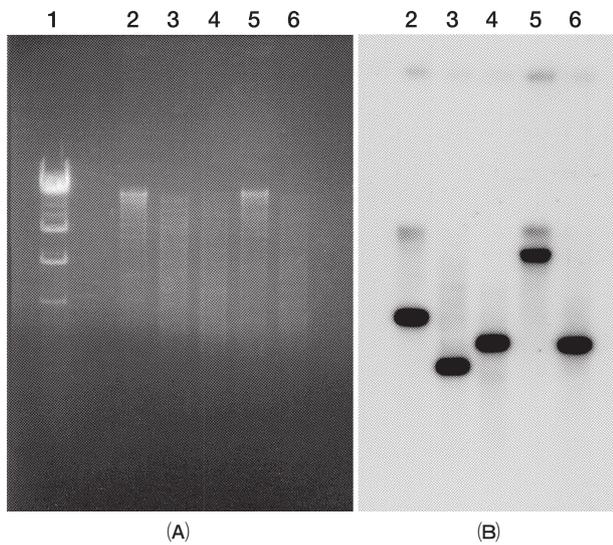


Fig. 2 Southern blot hybridization analysis of *A. facilis* AIU409 chromosomal DNA with amplified N-terminal probe by PCR.

(A) Agarose gel electrophoresis; Chromosomal DNA was digested by the restriction enzyme of lane 2 to 6. Lane 2, *Bam*HI; lane 3, *Eco*RI; lane 4, *Pst*I; lane 5, *Sal*I; lane 6, *Sma*I; and lane 1 molecular weight standards (λ *Hind*III)
(B) Autoradiogram

によってホワイトコロニーを約3,500株得ることができた。得られた3500株のホワイトコロニーを先程と同じ *Eco*RI カセットの1.4 kb 断片をプローブに用いて、コロニーハイブリダイゼーション法によるスクリーニングを行った。シグナルの得られたコロニーからプラスミド抽出し、制限酵素地図を作製した結果が Fig. 3 (a)である。インサート DNA の矢印部分にエステラーゼ遺伝子が含まれていることが明らかになり、Fig. 3 (b)に示すシーケンス戦略によって、エステラーゼ遺伝子の塩基配列の決定を行った。

エステラーゼ遺伝子の塩基配列の決定

今回、本酵素の完全な ORF (1881 bp) がクローニングされ、全塩基配列が決定された。Fig. 4 にその全塩基配列と予想アミノ酸配列を示す。さらに、上流域にプロモーター配列と考えられる-35位の TCGCCA と、-10位の TATAA のコンセンサス配列や、翻訳開始点と考えられる Shine-Dalgarno 配列 (SD 配列) の GGAGA の配列が確認された。また開始コドンは ATG であった。本酵素の下流域には終止コドン TGA と、GC を多く含むパルンドローム配列が存在し、この部分でステム・ループ構造を形成し、転写終結シグナルとなっている。また、このステム・ループ構造のすぐ後に連続T構造が見られることから、本酵素遺伝子の転写終結シグナルはロー因子非依存性であると考えられる。各アミノ酸をコードしているコドンは、第3塩基が、A, T よりも G, Cの方が多く、シーケンスから解析し

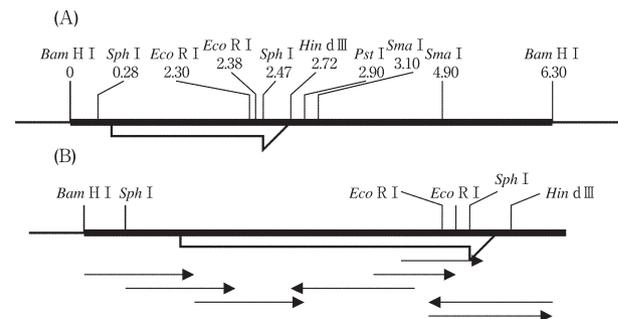


Fig. 3 Restriction map of *Bam*HI fragment of pAET3 containing the *estA* gene (A) and the sequencing strategy for the *estA* gene of *A. facilis* AIU409. The positions and directions of transcription of the *estA* genes are indicated by the bold arrows. The bold lines are *Bam*HI fragment of genome DNA of *A. facilis* AIU409.

1 AAAAAGTCCCCACCTCTTAAGCCGCTTCCCTGCCGGGAGGCGGCTTTTTTCATTGCATCTCCACGTCACCTTTCCGTCGCCAGCCTA
 91 ACCATTGCGTGATATAAGACGCCAAAGGTAAGACAAAACGGGAGACACGACCATGAGGAAAACAGGCTTCTGGCCGGTGTGCAGCGC
 181 TTAGCCTGATGGCGGCCCGCGCAAGGCGGCAATCTTTATGTGTTGGCGACAGCCTTTCCGATGACGGCAATCTTTATAAACTCA
 271 CCGGGTCCCGCCGCCCTTATATCAGGGCCGTTTTCCAACGGGCGGCTCTGGGTGGAATATCTACCGGGCTGACCGGGCTCGGAT
 361 TTTCTCAGCCAATGACTATGCCTATGGCGGGGCTTACCGGGGCGTACCATCGGCACCACCAATGCCGGGACCAATCTGGAAGCGG
 451 GCGGCTGCCGGGATCAGCACGAGATCGCTTCTGTCACGGCGGGGGGAGTTTCGGGCGAATGATGTGTCACACTCTGGGGCG
 541 GGGCGAATAATTACTTCGCTATGCGGCGGCGTGCAGGCCAACCGGGCGGCCACCGCGTGGTGACGACGGGTCTCACCCAGCA
 631 TCACGACGCTCACCCAGGACACACAGCGTATCAATCTCGGCGCCAGGATGCTGATTGTGCCAACCTGCCGGATCTGGGGTACGC
 721 CGAATTTCAACACCACCGCGCAAGGCGTGGCGCTGGGGGATGCGTTCTCGCAGGCGCATGATGGGGCGCTGCCGACCGAGATGCAATGTC
 811 TGCATCAGGGCACCGGGGCGAATATCATCGTCTGAATACCGAGGCGTGTGACCGGAGCATTGCGACGAGAATAGCTATCTGTTCTGGCTTCA
 901 CCAACGTGACCAATGCCTGCTTTACACGGTAAGCTGTGTCACCGGAGCATTGCGACGAGAATAGCTATCTGTTCTGGCTTCA
 991 ACCCGACCCCATGCGCATCAGATCATCGCGCAATATGACGCGCCTCGCTGCAAGGCTTTGAGAGCCTGACGGTCCCGGACCGGGTGA
 1081 ATGCGAATGCCCGGAGATTTCGCGGGGCTGCTGAATGCGCGCTTGGATGCGTTGACAGAACGGCGCCAGCGGGCCTCTGATGACATTA
 1171 ACGGGTGAATGGCGCACCGCGCATCCGCGCATAAAGTGGCGATGTTCTCTCCGTCACCGGCCAGTTCGGCACCCGCAAGACCGAGG
 1261 GTTGTAGCGGCTATAATTATTCGACGCGGCTGACGGCGCTGGGGTGGATATGCGGGTGAATGAGCATCTCACCGCGGCTCTCGC
 1351 TCGCCTATAACAACCCATGCGAATGTGAGCGGGCGGCGCGGTGACGAGTAACCGCGTGGATGTGCGGGTGTATGCGCTGGCGACT
 1441 CCGCGCACGCTATGCCAAGCTCTATGCCGCTGGGACCATGACAATGACAAAACCGGCAACGGGGTATTGGCGGCATCACCGGCA
 1531 AACCTTCGGGCACGCTGGAGTGGCGGGCGGCGTGGGGCTGAAATTCATCCGACGACGACGATCGCGGTGGGGCCGGAATTCGGTC
 1621 TGGGCTACCCAGAGCGGGTGGCAATTATACCGAGACCGCGATGCGCTGCTGACCCAGAGCGTGAATTCGCAAAGCTATAAGCAGC
 1711 TGGTCCGAGTCCCGGCGCACGTTGCGACGAGCTGACGCTGGCGCGGCTGGCGCTTCCCGCATGCCGGGGCGGCGGTGAGTTTC
 1801 TGCTGCCGGGCCGAACGAGCTTACGCTCCGCTTACCAGTGTGCGCGGCGTACGCTGACCAACAGCTACCCGACCCAGACGGGCA
 1891 GCTGGGGCTTGTCAACCTGGGTGTGAGTGCACATTCACCGAGCTTTCAGCGCCAGCCTGGAGGCGGCCACCGCCCTTCAAGAGCG
 1981 ACGGCAATGACACGAGGTCACCGCAACGCTCTCTGGCGTTCTGAACAGCGCGCCGGGCAAGCGCAAGGGCTTGGCCCGCGAAAA
 2071 ATTTAAGACTCGTTTTGCGGAGGCGGCTGTCTAGAAGCTTACGCTGACTGTGATGCTACTGTACGTATCGCGCCTATGGAATGGCCTT
 2161 AT

Fig. 4 The nucleotide sequence of *estA* gene and the predicted amino acid sequence.

The Shine-Dalgarno sequence is shown by the wavy line. The putative -35 and -10 regions are underlined. The amino acid sequence of the N-terminal and the peptide obtained with the direct N-terminal amino acid sequencing is double-underlined. The box sequence represents the lipase consensus motif "G-X-S-X-S" and the signalpeptidase consensus sequence motif "A-X-A". The location of a potential terminator structure is marked by facing arrows.

た GC 含量は、62.5%と比較的高かった。

本酵素は、627アミノ酸からなり、N末端の23アミノ酸残基はシグナルペプチドと考えられる。その証拠にシグナルペプチダーゼの認識配列である A-X-A の配列が観察される。本酵素の予想アミノ酸配列より分子量を計算したところ、シグナルペプチドを含めた大きさは64,140であり、シグナルペプチドを除いた部分の大きさは、61,846であった。

リパーゼのコンセンサス配列には、G-X-S-X-S と

G-X-S-X-G の2種類の配列が存在する。本酵素遺伝子上には、G-D-S-L-Sが存在し、リパーゼやエステラーゼ、さらに、大腸菌のチオエステラーゼに共通して存在している保存領域の G-X-S-X-S と一致する配列であった。この保存領域の周辺アミノ酸配列は、*Aeromonas hydrophila* のアシルランスフェラーゼや、*Xenorhabdus luminescens* のリパーゼ及び、*Vibrio parahaemolyticus* のホスホリパーゼなどの、他の脂肪分解酵素と相溶性が高く、高度に保存され

た領域であった。また、このコンセンサス配列はN末端付近に存在するという特徴を持っており、このモチーフは、本酵素の触媒ドメインの活性部位を構成している配列と考えられる。このモチーフのN末端側のセリン残基は活性中心を形成していると示唆されている。大腸菌のクローン株を用いてエステラーゼ活性の測定を行ったが、活性を確認することはできていない。今後、発現ベクターの構築など更なる研究が期待される。

要 約

好酸性従属栄養細菌 *Acidocella facilis* AIU409株は、基質としてソルビタンモノエステルである Tween を含む培地中で培養された時に、菌体外に熱安定性の高い酸性エステラーゼを生産する。エステラーゼをコードする遺伝子 (*estA*) を *A. facilis* AIU409株のゲノムライブラリーから単離し、大腸菌 MV1184 にクローニングし、その遺伝子の全塩基配列を決定した。その結果、*estA* の構造遺伝子が、1881塩基対であることが明らかになった。酸性エステラーゼ遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF) は、627アミノ酸残基(計算された分子量は64,140ダルトン)をコードしていた。ロー因子非依存性の転写終結シグナルが終止コドンである TGA のすぐ下流に存在していた。そのN末端予想アミノ酸配列より、酸性エステラーゼの前駆体は、N末端に23個のアミノ酸残基から成るシグナルペプチドを有していた。また、リパーゼのコンセンサス配列である G-X-S-X-S の配列が存在することが明らかとなった。酸性エステラーゼの予想アミノ酸配列から計算された分子量は61,486であり、これは SDS-PAGE によって予想されていた分子量より、やや低い値であった。また、*Acidocella facilis* 酸性エステラーゼの予想アミノ酸配列は、*Aeromonas hydrophila* 由来の acyltransferase^{12,13)} や *Xenorhabdus luminescens* 由来のリパーゼ¹⁴⁾ と高い相同性を示した。

文 献

- Harrison, A. P. Jr. : Genomic and physiological comparisons between heterotrophic thiobacilli and *Acidiphilium cryptum*, *Thiobacillus versus* sp., and *Thiobacillus acidophilus* nom. Rev. Int. J. Syst. Bacteriol., **31**, 327-332 (1981)
- Wichlactz, P. L., R. F. Unz and T. A. Lanworthy : Hetrophilic bacteria of acidic mine waters. Int. J. Syst. Bacteriol., **36**, 197-201 (1986)
- Lobos, J. H., T. E. Chisolm, L. H. Bopp and D. S. Holmes : *Acidiphilium organovororum* sp. nov., An acidophilic heterotroph isolated from a *Thiobacillus ferrooxidans* culture. Int. J. Syst. Bacteriol., **36**, 139-144 (1986)
- Kishimoto, N., Y. Kosako, N. Wakao, T. Tano and A. Hiraishi : Transfer of *Acidiphilium facilis* and *Acidiphilium aminolytica* to the Genus *Acidocella* gen. nov., and Emandation of the Genus *Acidiphilium*. System. Appl. Micbiol., **18**, 85-91 (1995)
- Aldova, E. et al. : Tween-esterase activity in *Enterobacter sakazaki*. Zbl. Bakt. Hyg. A., **83**, 233-236(1991)
- Donaghy, J. and A. McKay : Extracellular carboxylesterase activity of *Fusarium graminearum*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **37**, 742-744 (1992)
- Saito, H., H. Tomioka, T. Watanabe and T. Yoneyama : Mycobacteriocins produced by rapidly growing mycobacteria are Tween-hydrolyzing esterase. J. Bacteriol., **153**, 1394-1300 (1983)
- Isobe, K. and N. Wakao : Tween-hydrolyzing esterase produced by *Acidiphilium* sp., J. Gen. Appl. Microbiol., **42**, 285-295 (1996)
- Isobe, K. and N. Wakao : Purification and some properties of a thermostable acid esterase from *Acidiphilium* sp. AIU409. J. Gen. Appl. Microbiol., **43**, (1997)
- Ohkawa, I. : An esterase on the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* for the hydrolysis of long chain acyl esters. J. Biochem., **86**, 643-656 (1979)
- Tomioka, H. : Purification and characterization of the Tween-hydrolyzing esterase of *Mycobacterium smegmatis*., **155**, 1249-1250 (1983)
- Thornton, J., S. P. Howard and J. T. Buckley : Molecular cloning of a phospholipid - cholestol acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. Sequence homologies with lecithin - cholestol acyltransferase and other lipases. Biochem. Biophys. Acta., **959**, 153-159 (1988)
- Roberthon, D. L., S. Hilton, K. R. Wong, A. Kopke and J. T. Buckley : Influence of active site and tyrosine modification on the secretion and activity of the *Aeromonas hydrophila* lipase/acyltransferase. J. Biol. Chem., **269**, 2146-2150 (1994)
- Wang, H. and B. C. A. Dowds : Phase variation in

Xenorhabdus luminescens : Cloning and sequencing of the lipase gene and analysis of its expression in

primary and secondary phase of the bacterium. J. Bacteriol., **959**, 1665-1673 (1993)