

## 중성 Lipase를 생산하는 *Bacillus subtilis* JKA-3의 분리 동정 및 효소 특성

조지원<sup>1</sup> · 허성호<sup>2</sup> · 한용수<sup>3</sup> · 김지연<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>인제대학교 대학원 분자의생명공학과, <sup>2</sup>동의과학대학 임상병리과, <sup>3</sup>광양보건대학 피부미용과,  
<sup>4</sup>인제대학교 대학원 분자의생명공학과, 기초대학

## Isolation of Lipase Producing *Bacillus subtilis* and Some Characteristics of the Enzyme

Ji-Won Jo<sup>1</sup>, Sung-Ho Hur<sup>2</sup>, Yong-Soo Han<sup>3</sup>, and Ji-Yeon Kim<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Molecular & Biomedical Technology, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

<sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Dong-eui Institute of Technology, Busan 614-715, Korea

<sup>3</sup>Department of Cosmetology, Gwangyang Health College, Gwangyang 545-703, Korea

<sup>4</sup>Graduate School of Molecular & Biomedical Technology, College of General Education, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

Received August 28, 2009; Accepted September 8, 2009

As part of an investigation to identify microorganisms that are biotechnologically interesting for industrial application, we isolated a bacterial strain from *Chungkookjang* that produces extracellular neutral lipase. In addition, the crude enzyme was characterized. This isolated strain, designated as JKA-3 was identified as *Bacillus subtilis* JKA-3 based on morphological, physiological and biochemical characteristics, as well as phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequence. The cells were rod-shaped and 0.6-0.8×2.0-2.3 μm in size. Optimal growth conditions were 35-40°C and pH 6.0-8.0. The isolate was able to grow in up to 0-10.0% (w/v) NaCl. Optimal activity conditions of the crude lipase fraction of *B. subtilis* JKA-3 were pH of 7.0 at 35°C. This enzyme was stable in the pH ranging 6.0-8.0.

**Key words:** *B. subtilis* JKA-3, characterization, enzyme production, identification, neutral lipase

Lipase(glycerol ester hydrolase, triacylglycerol lipase, E.C. 3.1.1.3)는 triglyceride의 ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 지방산(fatty acid)을 생성하는 효소로서 생물계 전반에 널리 분포되어 있으며, 특히 다양한 종류의 lipase가 미생물로부터 발견되었다[Jaeger 등, 1994]. 산업적으로 응용되고 있는 많은 효소들 가운데 lipase가 차지하는 역할은 매우 중요하며, 급속히 성장하고 있는 생물 산업에서 주목받고 있는 효소 중 하나이다. Lipase는 촉매 반응의 다양성과 특수성(hydrolysis, alcoholysis, acidolysis, esterification, aminolysis 등)을 갖고 있으며, 수용액 상태에서 뿐만 아니라 유기 용매에서도 활성을 나타내어 사용

할 수 있는 반응의 범위가 넓다. 또한 조효소(cofactor)가 필요하지 않아 촉매 반응을 진행하는 데 편리하고, 기질 특이성이 매우 넓다. 그리고 광학 이성질체 중 어느 한쪽에 대해서만 활성을 나타내는 이성질체 선택성도 지니고 있다. 이러한 특성으로 인해 lipase는 여러 산업 분야에서 다양하게 이용되고 있으며, 점차 그 응용범위가 확대되어 가고 있다[Jaeger와 Reetz, 1998]. 이 밖에도 반응공정 후 처리가 깨끗하여 환경오염이 적고, 생산물과 촉매의 분리가 쉬워 분리과정에 들어가는 비용을 절감시킬 수 있으며, 촉매의 재사용이 가능하기 때문에 많은 비용을 절감시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다[Schmidt-Dannert, 1999].

미생물 중 lipase를 생산하는 것으로 알려진 세균으로는 *Staphylococcus*속(genus)과 *Chromobacterium*속, *Achromobacter*속, *Micrococcus*속, *Bacillus*속, *Pseudomonas*속, *Alcaligenes*속 등이 있다[Lin 등, 1996]. 미생물이 생산하는 lipase는 기질특이성이 넓고, 유기용매에서 안정하며, 다양한 pH와 온도에 적용할 수 있어 널리 이용되어 왔다[Demirjian 등, 2001; Schmid 등, 2001; Jaeger와 Eggert, 2002]. 따라서 상업적으로 잠재력이

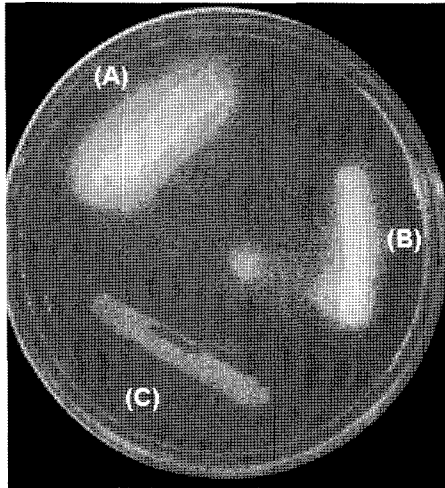
\*Corresponding author

Phone: +82-55-320-3737; Fax: +82-55-339-3734

E-mail: biokjy@inje.ac.kr

**Abbreviations:** LB, Luria Bertani; PCR, polymerase chain reaction; pNPP, p-nitrophenyl palmitate

doi:10.3839/jabc.2009.026



**Fig. 1. Halo formation by strain JKA-3.** The cells were streaked and grown on LB agar supplemented with 1.0%(v/v) tributyrin at 35°C for 16 h. (A) strain JKA-3 (B) *B. megaterium* (lipase positive, control) (C) *B. megaterium* (lipase negative, control)

큰 미생물 유래의 lipase에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 앞으로 더욱 그 필요성이 요구된다.

실제로 미생물 유래의 lipase는 지방 제거와 촉매제로서의 이용범위가 확대되어 식품첨가물(food additive material)과 산업용 시약(Industrial reagents), 세탁 첨가제(detergent additives), 의약품 진단시약(diagnostic reagent), 유지제품(cocoa butter equivalent) 등에서 다양하게 사용되고 있다[Schmidt-Dannert, 1999]. 미생물 유래의 lipase는 공급되는 영양소에 따라 기질특이성과 작용기작 등이 다양하고[Park 등, 2004] lipase의 역가도 배양조건에 따라 다르므로, 미생물 유래 lipase의 생산성에 관한 연구를 위해서는 우수 균주의 분리과 동정, 배양조건 등에 대한 전반적인 지식이 뒷받침되어야 할 것이다. 더욱이 산업적으로 유용한 lipase는 생산 단가가 비싸고, 고온이나 유기용매 상에서 불활성화 되는 단점을 지니고 있다는 것이 문제로 제시되고 있어, 이를 극복하기 위해서는 lipase의 대량 발현 시스템 구축과 그 효소 특성에 대한 분석이 필요하다.

본 연구에서는 산업적으로 주목받고 있는 lipase를 탐색하던 중 lipase 활성을 나타내는 *Bacillus* sp.를 청국장으로부터 분리 동정하였고, 분리 균주가 생산하는 lipase의 조효소에 대한 일반적인 특성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

청국장 시료(우호환의원 제공)를 희석하여 LB[0.5%(w/v) yeast extract, 1.0%(w/v) tryptone, 1.0%(w/v) NaCl, 1.5%(w/v) agar] 배지에서 균체 생육이 우수하고 서로 다른 형태적 특징을 가진 것만을 선별하여 순수 분리하였다. 이들을 1.0%(v/v) tributyrin(ACROS, USA)이 함유된 LB 배지에서 배양하여 tributyrin 분해능이 가장 우수한 분리 균주 JKA-3를 최종적으로 선발, 본 실험에 사용하였다[Diaz 등, 1999](Fig. 1).

최종 선정된 JKA-3를 관찰한 결과 그람 양성의 간균(0.6-0.8×2.0-2.3 μm)으로 포자와 협막을 형성하였고, 운동성을 지닌 호기성의 세균이었다(Table 1). 그리고 25-45°C에서 잘 성장하였으며, 최적 생장온도는 35-40°C였다. pH 5.0-9.0에서 잘 성장하였으며, 생장을 위한 최적 pH는 6.0-8.0로 중성 영역의 환경에

**Table 1. Characteristics of the isolated strain JKA-3**

Morphological characteristics	
Shape	Rod
Cell size (μm)	(0.6-0.8)×(2.0-2.3)
Motility	Motile
Gram stain	+
Spore formation	+
Characterization of cultures on LB agar plates:	
Colony color	White
Form	Circular
Elevation	Flat
Margin	Wavy
Opacity	Opaque
Brilliance	No glistening
Cultural characteristics	
Temperature (°C) for:	
Optimum growth	35-40
Growth range	25-45
pH for:	
Optimum growth	6.0-8.0
Growth range	5.0-9.0
Growth in NaCl at (% w/v):	
0.0	++
1.0	++
3.0	++
5.0	++
7.0	++
9.0	+
10.0	+
11.0	-
12.0	-
13.0	-

+, positive; -, negative

서 잘 성장함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *Bacillus* sp가 생산하는 lipase가 30°C와 pH 6.0에서 최적의 성장을 나타낸 보고와는 상이하였다[Erturula 등, 2007]. 또한 이 균주는 다양한 NaCl 농도(0-10.0%, w/v)에서도 성장하였으며, 항생제 optochin과 bacitracin에 대해 내성을 나타내었다(Fig. 2). 그리고 자동화 균주 동정기계 VITEK system(VITEK 2 Compact 60, bioMérieux Inc., Hazelwood, MO)을 이용하여 분리 균주의 생화학적 특성들을 조사한 결과 *B. subtilis*와 98%의 matching level을 나타내었다(자료 미제시). 위와 같은 형태적, 생리·생화학적 특성들을 종합하고 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [Claus와 Berkeley, 1986]에 기술된 분류 기준을 참조하여 동정한 결과 분리 균주는 *Bacillus*속으로 추정되었다.

분리 균주 JKA-3의 유전학적 특성에 따른 동정과 계통적 유연관계를 알아보기 위하여 PCR로 증폭 생산된 1.4 kb의 16S rRNA 유전자 염기서열을 결정하여 분석을 시도하였다(Fig. 3). 이 때 PCR에 사용된 primer는 16S rDNA 염기서열 결정에 사용하는 universal primer인 27f(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492r(5'-GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3')이었다[Weisburg 등, 1991]. 결정된 염기서열의 상동성 분석은 GenBank의 database에 등록된 16S rDNA 염기서열들의

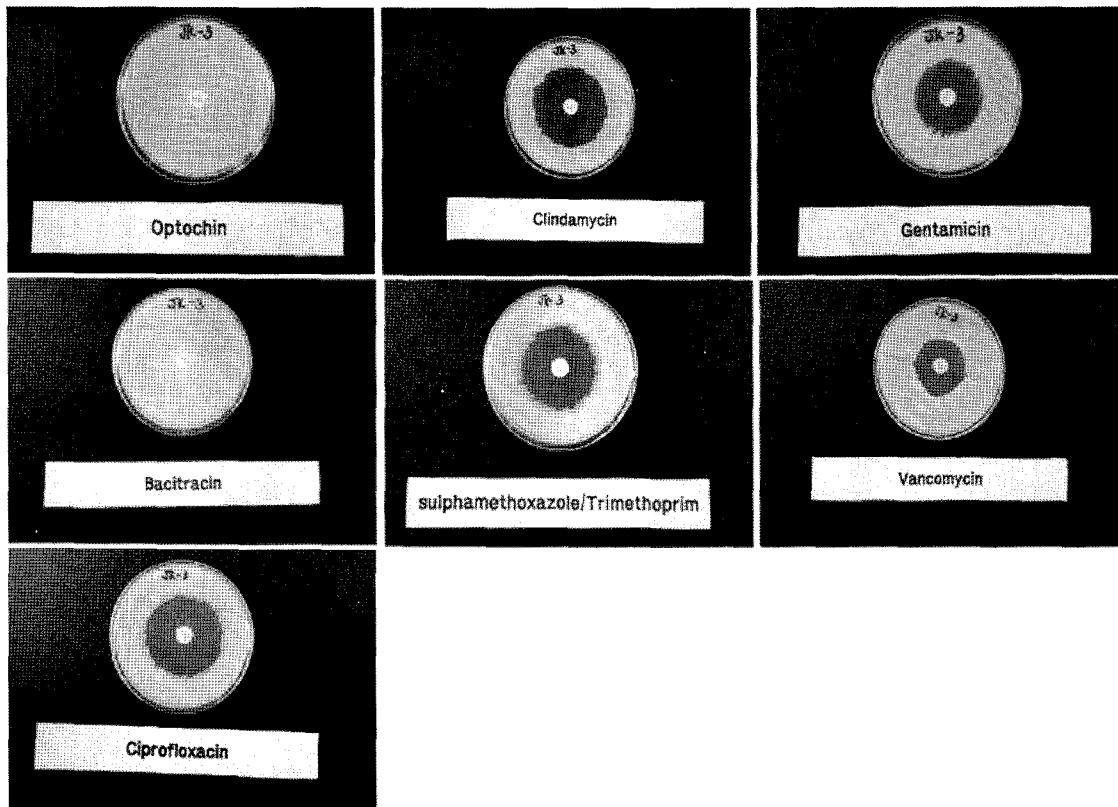


Fig. 2. Susceptibility test of the isolated strain JKA-3 to various antibiotics (bacitracin, ciprofloxacin, clindamycin, gentamicin, optochin, sulphamethoxazole/trimethoprim, vancomycin).

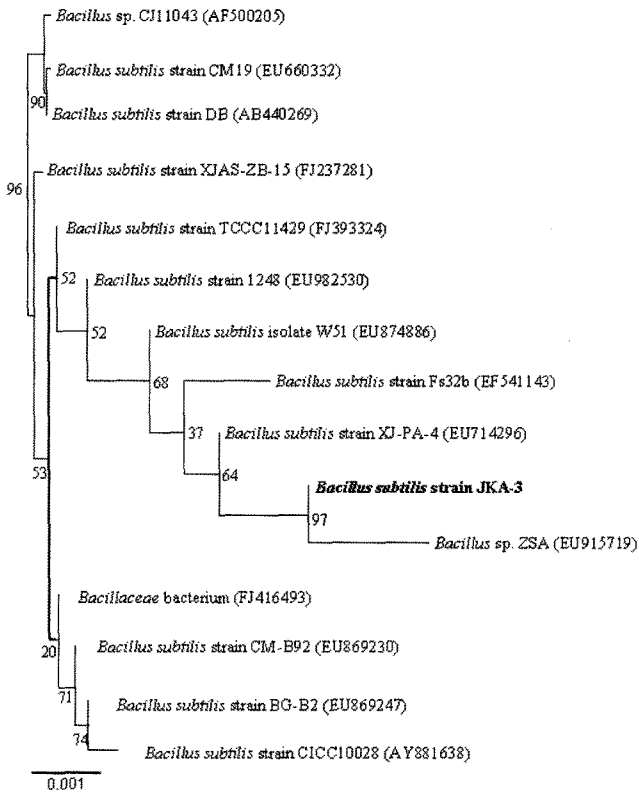
정보를 대상으로 BLAST 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, NCBI, Bethesda, MD)을 이용하여 수행하였다 [Altschul 등, 1997]. 계통분석은 CLUSTAL-X의 Multiple Sequence Alignment Program(Strasburg, France)을 이용하여 정렬하였고[Thompson 등, 1997], GenBank에 등록된 다른 균주들의 16S rDNA 염기서열 정보와 TreeView program을 이용하여 neighbor-joining method에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogenetic tree를 얻었다[Saitou와 Nei, 1987]. Branch의 신뢰도는 100회의 재구성된 자료로부터 새로운 tree를 작성하여 계산하였다. 분리 균주의 16S rDNA 염기서열을 기존에 등록된 다양한 세균들의 상응하는 염기서열과 상동성을 조사하여 본 결과 *B. subtilis* strain(Genbank accession number EF541144), *B. subtilis*(Genbank accession number M74010), *B. subtilis*(Genbank accession number EF567418), *B. subtilis* strain 361(Genbank accession number EF538417)과 99%의 유사성을 보였다(자료 미제시). 이들 분석결과를 토대로 하여 분리 균주 JKA-3는 *B. subtilis*로 최종 동정되었으며, *B. subtilis* JKA-3로 명명하였다.

분리동정된 균주의 lipase 활성을 조사하기 위하여 증배양액을 LB 액체배지에 0.1%(v/v) 접종하여 35°C에서 16시간 동안 본배양하고, 13,400×g로 10분간 원심분리한 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다. Lipase 활성 측정은 표준물질로 pNPP를 사용한 colorimetric 방법에 의하여 수행하였다[Reetz, 2002]. A 용액[10 mL isopropanol(Duksan, Ansan, Korea)+30 mg pNPP(Sigma, St. Louis, MO)]과 B 용액[0.2 M phosphate 완충용액

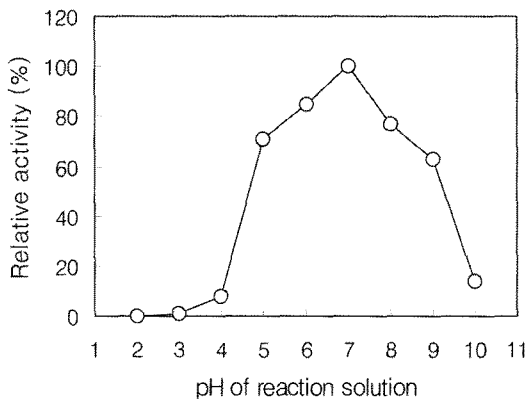
(pH 7.0) +207 mL Na-DOC(Duksan, Ansan, Korea)+100 mg의 gum arabic(Duksan, Ansan, Korea)]의 비율을 1:9로 한 D 용액을 조효소액과 2:1의 비율로 각각 혼합하였다. 혼합용액은 10분 동안 항온수조에서 효소 활성의 최적 온도로 반응시킨 후 C 용액[2 M NaCO<sub>3</sub>(Duksan, Ansan, Korea)]으로 반응을 정지시켰다. 이 반응 정지액을 원심분리하여 상등액을 취하고 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성도(Unit)는 위의 조건에서 1분 동안에 1 μmole의 palmitic acid를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

*B. subtilis* JKA-3가 생산하는 lipase의 최적 pH는 0.2 M glycine-HCl 완충용액(pH 2.0-3.0)과 0.2 M sodium acetate 완충용액(pH 3.0-5.0), 0.2 M Tris-malate 완충용액(pH 5.0-7.0), 0.2 M phosphate 완충용액(pH 7.0-9.0), 0.2 M glycine-NaOH 완충용액(pH 9.0-10.0)을 사용하여 효소 활성을 측정하고, 그 효소의 상대 활성으로 표시하였다(Fig. 4). 본 효소는 pH 5.0에서부터 9.0까지의 범위에서 60% 이상의 활성도를 나타내었으며, 특히 반응 최적 pH는 7.0으로 나타나 중성 lipase임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Khyami-Horani[1996]의 *B. licheniformis* 유래 lipase(pH 10.0), Meghwanshi 등[2006]의 *Bacillus* 유래 lipase(pH 9.0), Erturula 등[2007]의 *Bacillus* 유래 lipase(pH 6.0)와 상이하였다.

또한 pH 2.0에서 10.0까지의 각 pH별 완충용액에 조효소액을 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 방치한 후 각각의 효소를 회수하였다. 이를 35°C, pH 7.0에서 10분 동안 기질 용액과 반응시켜 pH에 대한 효소의 안정성을 측정하였다. Fig. 5에서 보는



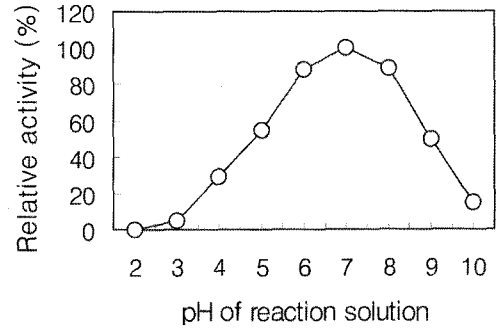
**Fig. 3.** Phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequences, showing the relationship between the isolated strain JKA-3 and other species belong to the genus *Bacillus*. The accession numbers are in parentheses. The tree was constructed using the CLUSTAL-X and neighbour-joining method. Scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position. Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) determined from 100 resampled data.



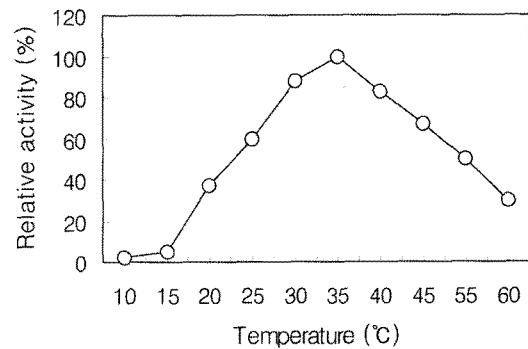
**Fig. 4.** Effect of pH on activity of the lipase produced by *B. subtilis* JKA-3. The enzyme reaction was carried out at 35°C for 10 min in 0.2 M glycine-HCl (pH 2.0-3.0), 0.2 M sodium acetate (pH 3.0-5.0), 0.2 M Tris-malate (pH 5.0-7.0), 0.2 M phosphate (pH 7.0-9.0) and 0.2 M glycine-NaOH (pH 9.0-10.0) buffer.

바와 같이 *B. subtilis* JKA-3가 생산하는 lipase는 pH 6.0-8.0에서 80% 이상의 높은 안정성을 유지하였다. 이는 Meghwanshi 등[2006]의 *Bacillus* 유래 lipase가 pH 8.0-11.0에서 안정하게 나타난 결과와는 상이하였다.

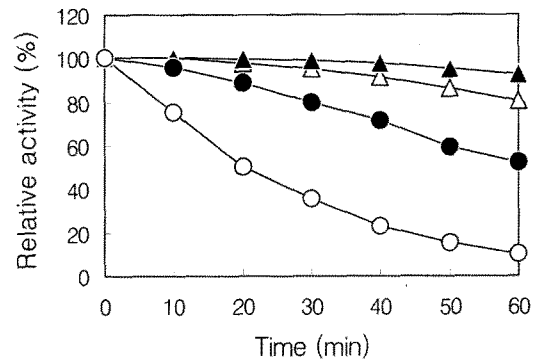
*B. subtilis* JKA-3가 생산하는 중성 lipase의 최적 활성 온도를 검토하기 위해 0.2 M phosphate 완충용액(pH 7.0)에 조효소



**Fig. 5.** pH stability of the lipase produced by *B. subtilis* JKA-3. The enzyme reaction was carried out at 35°C for 10 min after 24 h preincubation at 4°C at the various pH [0.2 M glycine-HCl (pH 2.0-3.0), 0.2 M sodium acetate (pH 3.0-5.0), 0.2 M Tris-malate (pH 5.0-7.0), 0.2 M phosphate (pH 7.0-9.0) and 0.2 M glycine-NaOH (pH 9.0-10.0)] buffer.



**Fig. 6.** Effect of temperature on activity of the lipase produced by *B. subtilis* JKA-3. The enzyme reaction was carried out at various temperatures for 10 min in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0).



**Fig. 7.** Thermal stability of the lipase produced by *B. subtilis* JKA-3. The enzyme reaction was carried out at optimal condition after preheating of the enzyme solution at the indicated temperatures for the different time periods. Symbols: ○-○, 20°C; ●-●, 30°C; △-△, 40°C; ▲-▲, 50°C

용액과 기질 용액을 혼합한 후, 온도를 10°C부터 60°C로 변화시키면서 효소 활성을 측정하여 상대 활성으로 표시한 결과는 Fig. 6과 같다. 본 균주가 생산하는 lipase의 최적 반응 온도는 35°C였고, 25-45°C에서도 60% 이상의 효소 활성을 나타내었다. Meghwanshi 등[2006]이 분리한 *Bacillus*가 생산하는 lipase의 활성은 37°C에서 가장 우수하였고, Khyami-Horani [1996]의 *B. licheniformis* 유래 lipase는 55°C에서 최적의 활성을 나타내

**Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain JKA-3**

Physiological characteristics	$\gamma$ -glutamyl transferase	-
oxidase activity	+ Alkalinisation test:	
catalase activity	+ argin dihydrolase	-
Biochemical characteristics	arginine	-
Acidification test:	lactate	-
amygdalin	+ pyruvate	+
cyclodextrine	- urease	-
D-galactose	- Assimilation test:	
D-glucose	+ 2-keto-D-gluconate	+
D-mannitol	+ acetate	-
D-mannose	- amygdalin	+
D-melezitose	- arbutine	-
D-ribose	+ citrate	+
D-tagatose	- D-cellobiose	-
D-trehalose	- D-galactose	-
glycogene	- D-galacturonate	-
inulin	+ D-gluconate	+
lactose	- D-glucose	+
L-rhamnose	- D L-lactate	-
maltose	+ D-mannose	-
maltotriose	+ D-melezitose	-
methyl-D-xyloside	+ D-melibiose	-
methyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	+ D-raffinose	-
methyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	+ D-sorbitol	-
myo-inositol	+ D-trehalose	-
N-acetyl-glucosamine	- D-turanose	-
palatinose	+ D-xylose	-
pullulan	- erythritol	-
raffinose	+ gentobiose	-
salicin	- glucuronate	+
sorbitol	+ glycerol	-
sucrose	+ lactose	-
xylose	+ L-arabinose	+
Enzymatic test:	L-glutamate	+
alanine arylamidase	+ L-malate	+
ala-phe-pro-arylamidase	- L-proline	-
alkalin phosphatase	+ L-rhamnose	-
ellman	+ L-sorbose	-
glycine arylamidase	+ methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosidase	+
L-aspartate arylamidase	- N-acetyl-glucosamine	+
L-leucine arylamidase	- nitrate	+
L-lysine arylamidase	- putrescine	+
L-proline arylamidase	+ sucrose	+
L-pyroglutamic acid arylamidase (pyrase)	- xylitol	-
L-pyrrolydonyl arylamidase	+ Precipitation test:	
phenylalanine arylamidase	+ esculin hydrolysis	-
phosphatidylinositol phospholipase C	- tetrazolium RED	-
phosphoryl cholin	- Inhibition test:	
PNP-N-acetyl- $\beta$ -D-galactosaminidase 1	- bacitracin resistance	+
tyrosine arylamidase	+ growth in 6.5% NaCl	+
$\alpha$ -galactosidase	+ kanamycin resistance	-
$\alpha$ -glucosidase	+ novobiocin resistance	-
$\alpha$ -mannosidase	- oleandomycin resistance	-
$\beta$ -mannosidase	- optochin resistance	+
$\beta$ -N-acetyl-glucosaminidase	- plomixin- $\beta$ resistance	-
$\beta$ -xylosidase	+ polymyxin- $\beta$ resistance	-

VITEK system was used; +, positive; -, negative

고 있는데, 본 균주가 생산하는 lipase의 최적 온도는 35°C로 이들에 비해 낮다. 이상의 결과에 따라 본 실험의 효소 활성 측정 조건은 최적 조건인 pH 7.0, 35°C에서 행하였다.

0.2 M phosphate 완충용액(pH 7.0)에 조효소액을 첨가하여 일정 온도에서 10-60분까지 10분 간격으로 효소액을 미리 반응시킨 후 최적 온도에서 10분 동안 잔여 효소 활성을 측정하는 방법을 이용하여 효소의 열안정성을 측정하여 그 효소의 상대 활성으로 표시하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 20°C에서는 60분 동안 90% 이상의 안정성을 유지하였으며, 30°C에서 60분간 열처리로 80% 이상 잔존활성을 보였고, 40°C에서 60분간 열처리 시 50% 이상의 효소 활성을 나타내었다. 50°C의 온도에서는 10분간 열처리 시 75%의 효소 활성이 존재하였으며 20분 가열한 결과 50%의 잔여 활성을 유지하였다. 이는 Khyami-Horani[1996]의 *B. licheniformis* 유래 lipase가 37-60°C의 범위에서 90% 이상 안정하였다는 결과와 Meghwanshi 등[2006]이 보고한 *Bacillus* sp. 유래 lipase의 경우 30-50°C에서 높은 열안정성을 보인 결과와는 상이한 것으로 확인되었다.

## 참고문헌

- Altschul SF, Madden TL, Schffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Claus D and Berkeley RCW (1986) Genus *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1105-1139, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, U.S.A.
- Demirjian DC, Francisco MV, and Cassidy CS (2001) Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Biotechnol* **5**, 144-151.
- Diaz P, Prim N, and Pastor FIJ (1999) Direct fluorescence based lipase activity assay. *Biotechniques* **27**, 697-699.
- Erturula S, Dnmeza G, and Takab S (2007) Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *J Hazard Mater* **149**, 720-724.
- Jaeger KE and Reetz MT (1998) Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* **16**, 396-403.
- Jaeger KE and Eggert T (2002) Lipase for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 390-397.
- Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Heuvel M, and Misset O (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 29-63.
- Khyami-Horani H (1996) Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. *World J Microbiol Biotechnol* **12**, 399-401.
- Lin SF, Chiou CM, Yeh CM, and Tsai YC (1996) Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1093-1095.
- Meghwanshi GK, Agarwal L, Dutt K, and Saxena RK (2006) Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates. *J Mol Catal B Enzym* **40**, 127-131.
- Park MH, Ryu HJ, and Oh KK (2004) Isolation of lipase producing yeast and optimization of cultivation condition.

- Korean J Biotechnol Bioeng* **19**, 148-153.
- Reetz MT (2002) Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 145-150.
- Ruiz C, Pastor FIJ, and Diaz P (2002) Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiol Lett* **217**, 263-267.
- Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiner A, Wubbolts M, and Witholt B (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**, 258-268.
- Schmidt-Dannert C (1999) Recombinant microbial lipase for biotechnological applications. *Bioorg Med Chem* **7**, 2123-2130.
- Thompson, JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, and Higgins DG (1997) The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier A, and Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**, 697-703.