

## 포도당에 의해 합성억제되는 알칼리성 Lipase를 생성분비하는 *Pseudomonas aeruginosa* 균주의 분리 및 이 효소의 정제

이정미 · 김란숙 · 김병오 · 박영덕 · 진익렬\*  
경북대학교 자연과학대학 미생물학과

### Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* Strain Producing an Extracellular Alkaline Lipase Catabolically Regulated by Glucose, and Purification of the Lipase

Lee, Jung Mi, Ran-suk Kim, Byung-O Kim,  
Young-Duck Park and Ingyol Jin\*

Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

**Abstract** — Producing an extracellular alkaline lipase, this isolate JM123 was identified as a *Pseudomonas aeruginosa* strain from the results of the analyses of its morphological, biochemical and physiological properties. This strain showed the highest productivity of alkaline lipase when grown at pH 9.0 and 30°C for 13~20 hours in the medium of 2% starch, 1% soytone, 0.5% peptone and 1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. However, this enzyme was greatly repressed when grown in the glucose containing medium. The culture broth was fractionated by the order of the ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-200 gel filtration, DEAE-cellulose column chromatography, and Sephadex G-150 gel filtration. The fraction purified on the Sephadex G-150 gel indicated a single band of Mr 56,000 in the 10% SDS-PAGE electrophotogram. The purified enzyme showed its maximal activity at pH 9.0 and 42°C. The enzyme retained its activity even after the preincubation at the range of pH 5~10, but it was unstable over 60°C. The enzyme activity was markedly stimulated by sodium deoxycholate, cationic detergent like Tween 80 and non-ionic detergent like Triton X-100, whereas inhibited by Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, and anionic detergents like linear alkylbenzene sulfonate and sodium dodecyl sulfate.

Lipase로 상용되고 있는 glycerol ester hydrolase (EC 3.1.1.3)는 지질과 물의 현탁액(emulsion)의 상태에서 triglyceride ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 지방산을 생성하는 효소(1,2)를 총칭한다. 이 효소는 동물의 체액 중에서 처음으로 발견된 이래, 아주가리 종자중에서도 ricinus lipase로 존재함을 알게 되었고, 아울러 미생물성 lipase(4-23)도 알려지게 되어, 이 효소가 생물계 전반에 널리 분포되어 있음을 알게 되었다. Lipase는 그 작용 최적 pH에 따라 acidic lipase, neutral lipase, alkaline lipase로 나누어진다.

**Key words:** Extracellular alkaline lipase, *Pseudomonas aeruginosa*, catabolite repression

\*Corresponding author

미생물유래의 alkaline lipase에 대한 연구는 *Pseudomonas fragi*(16), *Planococcus* sp.(14), *Pseudomonas* sp.(20-22), *Geotrichum candidum*(7, 19) 등이 보고되어 있다. 미생물성 lipase의 공업적 이용에 대한 연구는 최근까지 활발하게 진행되고 있으며, 현재 *Rhizopus delemar* lipase(9), *Candida cylindracea* lipase(4, 5, 18), *Candida parapolitytica* lipase(6) 등은 공업적으로 생산되고 있다.

그런데 lipase는 오래전부터 연구되어 왔으나 protease나 amylase보다 비교적 많은 연구가 되어 있지 않는데, 이는 기질인 지질이 불용성으로 효소반응의 작용부위가 물과 지질의 interface이므로 효소의 최대 활성을 위해서는 emulsion을 증대시켜야 하고, 기질에

따라 그 구성 지방산의 종류가 다양하고 그 함유율이 다르기 때문에 정확한 작용기작을 알기 어렵고, 기질의 공급원이 주로 동물의 기관 혹은 식물의 종자 등으로 극히 제한되어 있는 때문이었다. 이와 마찬가지로 미생물성 lipase도 영양원의 급원에 따라 기질 특이성, 작용기작 등의 특이성이 다양하며, 역가는 배양조건에 따라 변동하므로 미생물성 lipase의 생산을 위해서는 우수균주의 선별, 배양조건 및 효소활성 측정 등에 대한 검토가 요구된다.

이 연구는 alkaline lipase를 생성하는 미생물을 검색하던 중, 이 효소의 생성시 glucose에 의해 합성이 억제되며, 생성한 효소를 체외로 분비하는 등의 성질을 가진 균주를 분리동정하게 되었고, 이 lipase를 정제하여 효소학적 성질을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주의 분리 및 동정

대구지역 일대의 토양과 하천수 및 유지공장의 침적지 토양에서 균주들을 분리했다. 1차 분리용 배지(3)에 균원 시료를 3단희석, 도달후 30°C에서 7일간 배양하여 선택한 균주를 2차분리용 배지(20)를 써서 다시 선별하였다. 선별한 균주를 액체배지(17)에서 배양후 효소활성을 측정하여 가장 활성이 높은 균주를 선별하였다. 분리한 균주의 형태적, 생리적, 생화학적 특성을 조사하여(27, 28), Bergey's Manual(29)의 방법에 준하여 동정하였다.

### 효소활성 측정

Lipase의 활성측정은 Lowry & Tinsley 방법(23, 24)을 다소 수식하여 사용하였다.

**기질조제(15, 25) :** Emulsion stock solution(20 mM Tris-HCl pH 9.0 buffer에 0.1 M NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM deoxycholate, 5% gum arabic을 함유)에 5% olive oil를 첨가한 후, blender를 이용하여 5분간 균질화하거나 sonicator로 50 Hz에서 10분간 처리하여 사용했다. 이 용액은 사용하기 직전에 조제하였다.

**Copper reagent :** Lowry & Tinsley 방법(24)에 의한 5%(W/V) Cupric acetate을 조제하여 Whatman 여과지로 여과한 후 pyridine으로써 pH 6.1로 조정하여 발색제로 사용하였다.

**방법 :** 기질 2.0 ml에 효소액 0.3 ml을 첨가하여 진탕배양수조(130 strokes/min.)에서 42°C, 1시간 동안

반응시켰다. 효소반응 정지액으로 6 N HCl 0.5 ml을 첨가한 후, 유리 지방산을 용해하기 위하여 isooctane 5.0 ml을 넣어서 혼합한 다음 100°C에서 5분간 처리하였다. 분리한 isooctane층에 발색제인 copper reagent 1.0 ml을 첨가하여 vortex한 후 흡광도 715 nm에서 측정하였다. 대조구는 효소액을 100°C에서 3분간 열처리하여 위의 방법으로 행하였으며, 효소 1 unit는 1분간에 1 μmole의 지방산을 유리하는 효소량으로 하였다.

**유리지방산의 정량(24) :** 유리지방산인 oleic acid를 각각의 농도별로 하여 isooctane 5.0 ml을 첨가한 다음, copper reagent를 첨가하여 발색시켜 715 nm에서 흡광도를 측정하여 유리지방산의 표준곡선을 작성한 다음, 이로써 시료의 유리 지방산을 정량하였다.

### 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 등(30)의 방법에 의하여 540 nm에서 흡광도로써 표시하였다.

### 효소의 정제

2l 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 10분)하여 상등액(조효소)을 50% ammonium sulfate로 염석하여 이 용액을 15,000 rpm, 10분간 원심분리하여 침전물을 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 용해시킨 다음, 동일 완충액으로 4°C에서 48시간 동안 투석하였다. 투석후 원심분리하여 그의 상등액을 동일 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-200 column(1.5×75 cm)에 넣고 동일 완충액으로 12 ml/h의 유속으로 용출시켰다. 이들 분획중 효소활성이 높은 분획을 모아 동결건조하여 농축한 용액을 동일 완충액으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column(4×35 cm)에 흡착시킨 후 NaCl(0~0.5 M)을 사용하여 stepwise 방법으로 용출시켰으며, 이때 60 ml/h의 유속으로 분획하였다. 그중 효소활성이 높은 분획을 모아 동결건조하여 농축한 용액을 동일 완충액으로 투석한 다음, 동일 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-150 column(1.5×75 cm)에 넣고 8.3 ml/h의 유속으로 2.5 ml/fraction씩 순차적으로 용출시켰다.

### 효소의 분자량 측정

정제된 alkaline lipase의 분자량은 Laemmli(31) 방법에 따라 10% SDS-polyacrylamide에서 전기영동

한 다음, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 대조구에 대한 상대적인 이동도에 대한 값으로써 측정하였다.

## 결 과

### 균주의 분리과 동정

Tween 80 함유 고체배지(3)에서 흰색침전이 생성된 colony를 1차 분리하였고, 이들을 gall powder가 함유된 olive oil plate(20)에서 배양하여 colony 주위에 투명대를 형성하는 균주를 2차 분리하여, 이들을 액체배지(17)에서 배양하여 효소활성이 가장 높은 1주를 선별하여 JM-123이라 명명하였다.

분리된 JM-123의 여러가지 생화학적 특성은 Table 1과 같았다. 이들의 성질로 미루어 보아 분리한 세

**Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the isolated strain JM-123**

Characteristics	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Isolated JM-123
Gram stain	-	--
Shape	Rod	Rod
Motility	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Arginine dihydrolase	+	+
Gelatin liquefaction	+	+
Starch hydrolysis	+	+
Casein hydrolysis	+	+
Urease	+	+
Triple Sugar-Iron agar	slant/butt:Red	slant/butt:Red
Kligler-iron agar	slant/butt:Red	slant/butt:Red
ONPG	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-
Nitrate reduction	d	-
Citrate utilization	+	+
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Utilizatin of:		
Glucose	+	+
Malonate	+	+
Fructose	+	-
Maltose, Arabinose, Rhamnose, Starch, Inuline, Lactose, Oxalate, Mannitol, Sorbitol, Adonitol, Galactose and Mannose	-	-

균은 *Pseudomonas aeruginosa*의 특성과 거의 일치하여, 이 균주를 *Pseudomonas* sp. JM-123으로 동정하였다.

### 효소생성을 위한 최적조건

**질소원의 영향**: 본 균의 증식과 alkaline lipase 생성에 미치는 질소원의 영향을 조사한 결과, 무기 질소원에서는 이 효소를 생성하지 못하였으나, 유기 질소원인 soytone 1.0%와 peptone 0.5%를 함께 첨가하였을 때 효소생성이 높았다.

**탄소원의 영향**: 이 효소의 생성에 미치는 탄소원 영향을 조사한 결과, 2% soluble starch를 사용하였을 때 효소생성이 가장 높았다. 그러나 탄소원으로 glucose를 첨가시 lipase생성이 억제되는 것으로 보아서 glucose에 대하여 합성억제를 받는것으로 생각되어 진다(Table 2). 이는 *Candida cylindracea*의 lipase 생성이 glucose에 의해 저해된다는 Yamada(5)의 보고와 일치했다. soluble starch는 동정실험에서 가수분해를 일으키지 않는 것으로 보아 모순점을 보이나, 이는 soluble starch대신에 유기질소원으로 사용한 soytone과 peptone에 존재하는 탄소원을 이용하기 때문이며 이와 유사한 결과(11)도 보고되어져 있다.

**온도의 영향**: 본 균의 증식과 효소생성에 미치는 온도를 조사하기 위하여 여러 온도에서 배양시킨 후, 균의 증식과 효소 생성능을 비교한 결과, 37°C 이상에서는 균의 증식 및 효소생성이 거의 없었으나, 30°C 배양시 가장 생성이 좋았다. 균의 증식 최적온도인 30°C 이상에서는 균의 증식이 저해되었다.

**초기 pH의 영향**: 본 균의 증식과 효소생성에 미

**Table 2. Effect of carbon source on the production of alkaline lipase by *Pseudomonas* sp. JM-123**

Carbon source (1.0%)	Cell growth (O.D. 600 nm)	Relative activity (%)
Glucose	1.58	3.0
Lactose	1.36	96.5
Sucrose	1.35	89.4
Soluble starch	1.35	100.0*
Galactose	1.49	61.7
Glucose + Soluble starch	1.64	2.0
None	1.40	86.7

Cultivation was carried out for 18 hours at 30°C in the medium containing 1.0% soytone, 0.5% peptone, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 9.5.

\*Specific activity; 1.78 μmole/min/mg

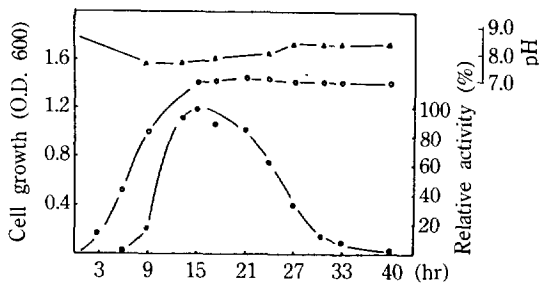
치는 배지의 초기 pH 영향을 조사한 결과, 균의 증식은 pH 5.0~10.0에서, 효소생성은 pH 9.0에서 높게 나타났다. 이 균주 JM-123은 넓은 pH 범위에서 증식할 수 있으며, 효소생성에 있어서도 초기의 pH는 별로 영향을 받지 않았다.

**그외의 조건 :** 무기염류가 lipase 생성에 미치는 영향을 본 결과 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O에 의해 효소 생성능이 향상되었으며 이 효소의 생성을 위한 최적 배지조성에 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 첨가하지 않을 때 균의 증식 및 효소생성능이 높았으나, *Candida cylindracea*(5), *Geotrichum candidum*(7), *Planococcus* sp.(14)에서는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 첨가시 효소생성능이 높았다. 배지내에 첨가한 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 일정한 알칼리성 pH를 유지하므로써 효소활성을 유지하고, Fig. 6에서 알 수 있듯이 산성에서 효소활성이 거의 억제되는 것을 방지하기 때문이라고 여겨진다.

**균의 증식 곡선과 효소 생성관계**

효소생성을 위한 최적조건에서 배양시간에 따른 균의 증식과 효소생성능을 조사한 결과, 균의 증식은 배양 13시간 이후, 효소생성은 배양 15시간에 최대에 도달하였다(Fig. 1). pH는 배양초기에 조금 떨어졌으나 시간이 지남에 따라 거의 원상태에 가깝게 되었다. 본 균주는 비교적 lag phase가 짧게 나타났으며, 효소생성은 균의 증식과 함께 증가하였으며, 13~20시간 배양후 균의 증식은 최고에 도달하였으며 효소활성도 최고이었다. 그러나 배양 13~20시간을 넘게 되면 효소실활이 일어남을 알 수 있었다.

**효소의 정제**



**Fig. 1.** The profile of the alkaline lipase production during cultivation of *Pseudomonas* sp. JM-123 in the shaking culture.  
○—○: Cell growth, ●—●: Enzyme activity, △—△: pH

효소생성을 위한 최적조건에서 균을 배양하여 얻은 배양액, 즉 조효소로부터 앞서 기술한 방법대로 정제한 결과, 10~14번 분획에서 효소활성 peak와 단백질 peak이 일치하는 결과(Fig. 2)를 얻을 수 있었다.

Sephadex G-150 gel filtration까지 정제과정을 거친 효소액을 SDS-PAGE 전기영동한 결과, 본 효소는 전기영동상에서 단일 band로서 나타나므로 정제되었음을 확인하였다(Fig. 3).

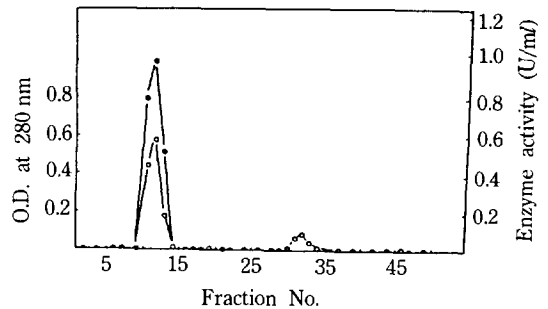
**정제된 효소의 분자량**

정제효소의 SDS-PAGE 전기영동상의 이동도를 Fig. 3과 같이 size marker와 비교도식하여 분자량을 측정해 본 결과, 56,000 정도로 추정되었다. 또한 영동상을 통해서 이 효소는 monomer인 것도 알게 되었다.

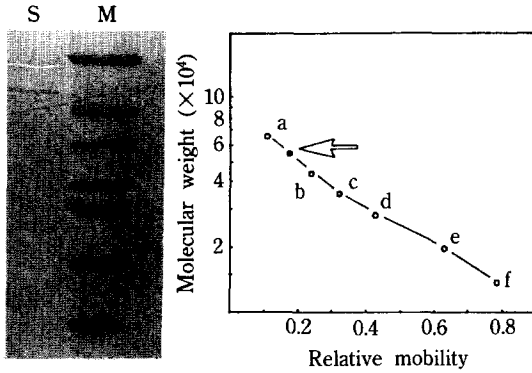
효소의 분자량은 Kawase(18) 등이 보고한 *C. cylindracea*의 분자량(5,000), Nishio(16) 등이 보고한 *P. fragi* 22.39B의 분자량(33,000), Muraoka(12) 등이 보고한 *S. aureus* 226의 분자량(34,000)보다는 크지만 Jacobsen(19) 등이 보고한 *G. candidum*의 분자량(57,000)과 비슷한 56,000 정도로 추정되었다.

**정제효소의 특성**

**온도의 영향 :** 효소활성에 대한 최적온도를 조사한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 olive oil을 기질로 했을 때 40℃ 부근에서 최대활성을 나타내었으며, 50℃에서는 활성이 급격히 감소하였다. 한편 효소의 안정성에 미치는 영향을 조사하기 위해 20 mM Tris-



**Fig. 2.** Elution profile of the alkaline lipase on Sephadex G-150 gel filtration.  
The active fraction from DEAE-Cellulose column was applied on a Sephadex G-150 column. Elution was carried out with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).  
○—○: optical density at 280 nm, ●—●: enzyme activity

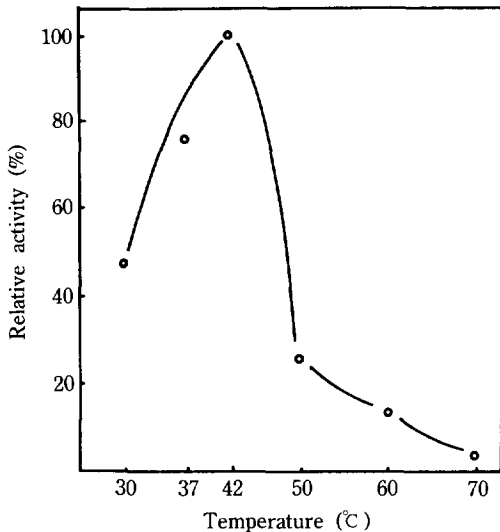


**Fig. 3. SDS-PAGE pattern of the purified alkaline lipase.**

Determination of molecular weight of enzyme subunits by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The standard markers are as follows: Bovine serum albumin (a: 66,000), Egg albumin (b: 45,000), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (c: 36,000), Carbonic anhydrase (d: 29,000), Trypsin inhibitor (f: 20,000),  $\alpha$ -Lactalbumin (g: 14,200).

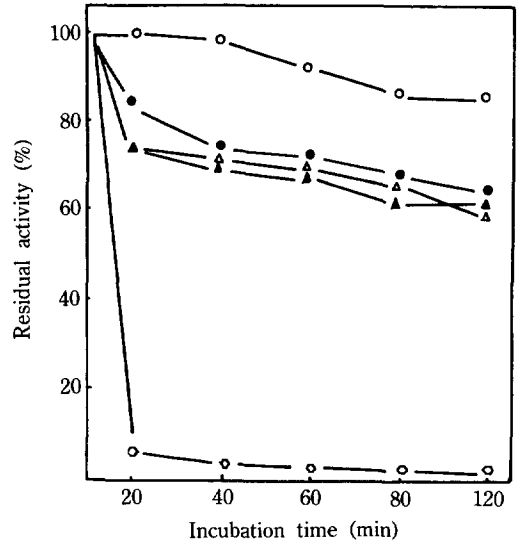
S: sample, M: standard marker



**Fig. 4. Effect of temperature on the alkaline lipase activity.**

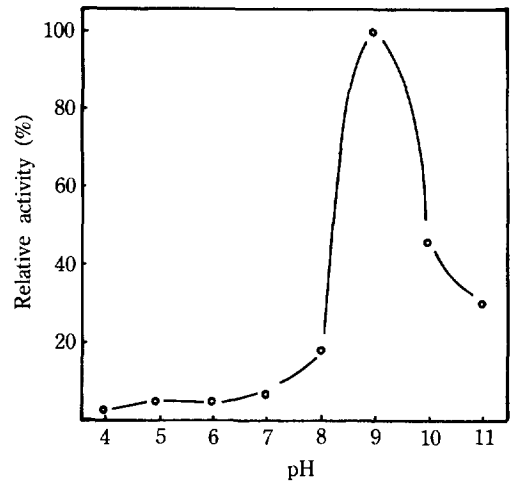
The reaction was carried out under the standard assay condition except that the reaction temperature was varied.

HCl buffer(pH 9.0)에 효소액을 첨가한 후, 각각의 온도에서 시간에 따른 잔존 활성도를 측정된 결과, 50°C 에서 120분까지는 비교적 안정하였으나, 60°C 에서 20분간 열처리할 경우 효소활성이 급격히 감소하



**Fig. 5. Effect of temperature on the alkaline lipase stability.**

Enzyme solution in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) was incubated at various temperatures. Residual activity was measured; 4°C (○), 30°C (●), 40°C (△), 50°C (▲), 60°C (○).



**Fig. 6. Effect of pH on the alkaline lipase activity.**

The optimal pH of lipase was determined using the following buffer system; Sodium acetate-acetic acid buffer (pH 4.0~5.0), Phosphate buffer (pH 6.0), Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.0), Glycine-NaOH buffer (pH 10.0~11.0).

였다(Fig. 5).

**pH의 영향** : 반응액의 pH를 변화시켜 42°C 에서 60분간 반응시킨 후 효소활성을 비교한 결과, 최적반응

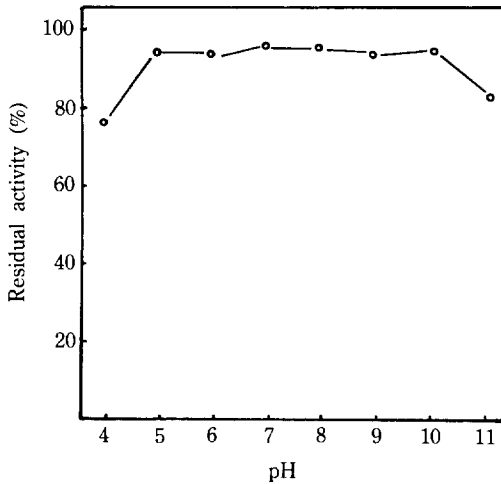


Fig. 7. Effect of pH on the alkaline lipase stability. The enzyme were incubated at 30°C for 10 hrs under each pH value and then the residual activities were measured.

pH는 pH 9.0이었다(Fig. 6). 효소의 안정성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 효소를 각각의 pH에서 10시간 동안 방치한 후 pH를 9.0으로 조정하여 기질을 첨가한 후 42°C에서 60분간 반응하여 잔존 활성을 측정된 결과 비교적 넓은 pH 범위에서 안정하였다(Fig. 7).

**금속염 및 각종 시약의 영향:** 금속염이 alkaline lipase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 이들 금속이온의 농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 효소활성을 측정하였다. 그 결과 금속이온에 의한 효소활성의 증가는 없었으나,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  등에 의해서는 저해를 받는 것으로 나타났다(Table 3). 이는 *P. fragi*(16)가 생성하는 alkaline lipase와 일치하였다. 이 효소의 활성은 EDTA, EGTA에 의해서는 저해를 받았으나, deoxycholate에 의해서는 약 2.5배 정도나 효소활성이 높아졌다(Table 4). 효소반응에 미치는 deoxycholate의 농도를 조사한 결과 0.1-0.3%의 deoxycholate 농도에서 최적 활성을 보였다. 그리고 담즙산가루에 의해서도 효소활성이 크게 높아졌음을 알 수 있었는데, 이는 lipase가 담즙산염에 의해 효소의 활성이 높아졌다는 보고(13, 20)와 일치했다. 그리고 SDS, LAS와 같은 음이온 detergent에 의해서는 본 효소활성이 강한 저해를 받았으나, Tween 80, Triton X-100과 같은 중성 detergent에 의해서는 효소활성이 높아졌다. 이는 이러한 중성 detergent가 기질의 유효안정화에 영향을 미친다고 생각되어지며 Watanabe

Table 3. Effects of metal ions on the alkaline lipase activity

Metal ions (1 mM)	Relative activity (%)
BaCl <sub>2</sub>	92.3
CaCl <sub>2</sub>	96.3
CdCl <sub>2</sub>	16.7
CoCl <sub>2</sub>	49.0
CuCl <sub>2</sub>	37.6
FeCl <sub>2</sub>	85.7
FeSO <sub>4</sub>	69.0
HgCl <sub>2</sub>	38.4
KCl	91.8
LiCl	103.0
MgCl <sub>2</sub>	108.8
MnCl <sub>2</sub>	95.3
NaCl	100.0
NiCl <sub>2</sub>	73.2
SnCl <sub>2</sub>	75.6
ZnCl <sub>2</sub>	5.7
None	100.0

Table 4. Effects of various reagents on the alkaline lipase activity

Reagents	Concentration	Relative activity (%)
EGTA	1 mM	70.7
EDTA	1 mM	74.8
Iodoacetate	1 mM	94.9
Oxalate-Na	1 mM	87.1
Phenolphthalein	1 mM	76.0
KCN	1 mM	107.1
Deoxycholate-Na	0.2%	236.9
Gall powder	0.2%	169.8
Tween 80	0.1%	165.0
SDS	0.1%	1.6
Triton X-100	0.1%	156.5
LAS	0.1%	6.0
None	0.1%	100.0

(11), Muraoka(12)등의 보고와 유사하였다.

## 요 약

토양으로부터 높은 활성의 alkaline lipase을 분리하는 미생물을 분리하여 동정한 결과 *Pseudomonas aeruginosa* 유연균으로 동정하였으며, alkaline lipase

최적생성조건을 조사한 결과 2.0% soluble starch, 1.0% soytone, 0.5% peptone, 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 함유한 배지에서 초기 pH를 9.0으로 조정하면 13~20시간 동안 진탕배양할 때 alkaline lipase 생성이 가장 좋았다. 이 균주로부터 생성되는 alkaline lipase를 염석, Sephadex G-200, DEAE-Cellulose, Sephadex G-150 gel filtration 과정을 통하여 정제하여 SDS-PAGE상에서 단일밴드임을 확인하였으며, 분자량은 약 56,000이었다. 정제된 효소의 특성을 조사한 결과, 최적 온도는 42°C 이었으며, 열안정성은 60°C 에서 20분 동안 처리로 효소활성의 90% 정도가 실행되었다. 또한 최적 pH는 9.0이었고 pH 안정성은 4.0~11.0으로 비교적 넓은 범위의 pH에서 안정성을 보였다. 또한 금속이온의 영향을 조사한 결과  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  및  $Cu^{2+}$ 에 의해서 효소활성이 저해되었으며, LAS, SDS와 같은 음이온 detergent에 의해 급격히 실행되었으며 deoxycholate 첨가시 활성이 약 2.5배 정도 증가되었고 0.1~0.3% 농도로 deoxycholate를 첨가시 최대 활성을 나타내었다.

### 참고문헌

- Desnuelle, P. 1972. The Lipases. Pp. 575-616. In P.D. Boyer (ed.), *The Enzymes*, Vol. 7, Academic Press, New York and London.
- 武内忠男, 小川和朗. 1980. Lipase. *新酵素組織化學*, Pp. 240-254. 朝倉書店.
- 町田晴夫. 1986. Lipase. *微生物 分離法*, Pp. 693-696. R & D Planning.
- Yamada, K. and H. Machida. 1962. Studies on the production of lipase by microorganisms, I/II. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*. **36**: 858-864.
- Yamada, K. and H. Machida. 1963. Studies on the production of lipase by microorganisms, III. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*. **37**: 645-648.
- Ota, Y. and K. Yamada. 1963. Studies on the production of lipase by microorganisms, V. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*. **37**: 653-657.
- Chung, M.J. 1973. Studies on the microbial lipase (II). *Research Review of Chungbuk National Univ.*, **8**: 163-170.
- Sugiura, M., M. Isobe, N. Muroya and T. Yamaguchi. 1974. Purification and properties of a *Chromobacterium* lipase with a high molecular weight. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 947-952.
- Iwai, M. and Y. Tsujisaka. 1974. The purification and properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 1241-1247.
- Iwai, M., S. Okumura and Y. Tsujisaka. 1975. The comparison of the properties of two lipases from *Penicillium cyclopium* Westring. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 1063-1070.
- Watanabe, N., Y. Ota, Y. Minoda and K. Yamada. 1977. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agr. Biol. Chem.* **41**: 1353-1358.
- Muraoka, T., T. Ando and H. Okuda. 1982. Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. *J. Biochem.* **92**: 1933-1939.
- Kokusho, Y., H. Machida and S. Iwasaki. 1982. Production and properties of alkaline lipase from *Alcaligenes* sp. strain No. 679. *Agr. Biol. Chem.* **46**: 1743-1750.
- Lee, S.H. and S.D. Hong. 1983. An alkaline lipase from *Planococcus* sp. *Research Review of Kyungpook National Univ.*, **36**: 397-405.
- Kwon, D.Y. and J.S. Rhee. 1984. Immobilization of lipase for fat splitting. *Kor. J. Chem. Eng.* **1**: 153-158.
- Nishio, T., T. Chikano and M. Kamimura. 1987. Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B. *Agr. Biol. Chem.* **51**: 181-186.
- Sztajer, H. and I. Maliszewska. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 492-497.
- Kawase, M. and A. Tanaka. 1989. Effects of chemical modification of amino acid residues on the activities of lipase from *Candida cylindracea*. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 44-48.
- Jacobsen, T., J. Olsen and K. Allermann. 1989. Production, partial purification, and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 90-95.
- Iizumi, T., K. Nakamura and T. Fukase. 1990. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agr. Biol. Chem.* **54**: 1253-1258.
- Chung, G.H., Y.P. Lee, G.H. Jeon, O.J. Yoo and J.S. Rhee. 1991. Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 2359-2365.
- Shin, W.-C., K.-S. Jeong, J.-H. Yu and J.-H. Yu. 1991. Purification and properties of alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. J-19. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 57-63.

23. Hoshino, T., T. Sasaki, Y. Watanabe, T. Nagasawa and T. Yamane. 1992. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 660-664.
24. Lowry, R.R. and I.J. Tinsley. 1976. Rapid colorimetric determination. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **53**: 470-476.
25. Kwon, D.Y. and J.S. Rhee. 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **63**: 89-94.
26. Kim, K.H., D.Y. Kwon and J.S. Rhee. Effects of organic solvents on lipase for fat splitting. *LIPIIDS*, **19**: 975-978.
27. MacFaddin, J.F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. Pp. 1-320, 386-388. 2nd ed. William and Wilkins, Baltimore London.
28. Cappuccino, J.G. and N. Sherman. 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Pp. 85-184, 2nd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.
29. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Pp. 140-219. Williams & Wilkins, Baltimore/London.
30. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randell. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
31. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.

(Received March 18, 1993)