

Serratia sp. AL-110이 생산하는 Alkaline Lipase의 생산 및 정제

최 청* · 김태완 · 조영제
영남대학교 자연자원대학 식품가공학과

Production and Purification of Alkaline Lipase from *Serratia* sp. AL-11

Cheong Choi*, Tae-wan Kim and Young-je Cho

Department of Food Science and Technology, Yeungnam University 712-749, Korea

Abstract — An alkaline lipase producing bacteria was isolated from soil and identified as *Serratia liquefaciens* AL-11. from the results of analysis 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 42 hours in the medium of 1% peptone, 0.5% tryptone, 0.9% yeast extract, 1% starch, 1% tween 80, 0.05% CaCl₂ and 0.05% NaCl. The enzyme was purified by ammonium sulfate treatment, Sephadex G-100 gel filtration and DEAE-Sephadex A-50 column chromatography. The specific activity of the purified enzyme was 27 unit/mg protein and the yield of enzyme activity was 61.3%. The homogeneity of the purified enzyme was verified by polyacrylamide gel disc electrophoresis. Molecular weight of the purified enzyme was estimated about 53,000 by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. This enzyme is composed of 17 amino acids of which glycine, proline and glutamic acid were three major acids.

Lipase(acylglycerol acylhydrolase E.C. 3.1.1.3)는 지질과 물의 현탁액상태에서 triglyceride의 ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 지방산을 생성하는 효소로서, 여러 연구자들에 의해 동, 식물 뿐만 아니라 많은 미생물들로부터 분리, 연구되어져 왔다(1). 현대산업사회가 발달함에 따라 각종 효소의 이용도가 급격히 증가하고 있는 가운데 lipase는 양조제품의 향기증진이나 치즈의 숙성, 야채류 발효시 유리지방산 증가, 육류숙성시 향기증가 등의 식품공업, 소화제 등의 제약공업, 피혁가공, 세제산업, 지방산제조 등의 화학공업 등 여러 분야에 걸쳐 광범위하게 이용될 수 있다. 특히, 제약공업에서는 오랫동안 동물의 pancreatin을 소화보조제로 이용하였다. 하지만 도살되는 동물의 수가 제한되어 pancreatin의 공급에 한계가 있으므로, 최근에는 pancreatin을 대용하기 위해 여러 미생물로부터 생산된 amylase와 protease, lipase 등을 사용하였다. 현재 *Rhizopus*와 *Aspergillus*, *Mucor*, *Sclerotinia* 등의 미생물로부터 생산된 lipase가 소화보조제로 사용되고 있지만, 이 모두가 pancreatic lipase와는 최적 pH, 담즙산염의 영향, 기질작용양상

등 그 효소학적 특성이 다르다(2).

따라서 본 연구에서는 소화보조제로 사용할 수 있는 lipase를 개발하기 위하여 토양으로부터 alkaline lipase 생성능이 우수한 균주를 분리, 동정하여 효소의 생산조건을 검토하였으며, 최적조건에서 생성된 효소를 정제하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

본 연구에 사용된 균주는 대구지역 일대의 토양과 하천수 및 유지공장의 침적지 토양을 균원시료로 하여 gall powder를 함유한 분리용 배지(3)와 rhode amine B를 함유한 triton glucose yeast extract(TGY) 배지(4)에서 halo zone을 형성하는 균주를 분리하여, 이들을 1% olive oil nutrient broth에서 30°C에서 3일간 배양, 효소활성을 측정하여 활성이 가장 높은 균주를 선별하였다(Table 1, 2, 3).

균주의 특성 및 동정

분리한 균주의 형태적, 생리적, 생화학적 특성을 조사하여, Bergey's manual(5,6)에 준하여, api 20E 그램 음성 장내세균 동정 kit와 비교분석하여 동정

Table 1. The composition of gall powder medium for screening

Gall powder	10.0 g
Olive oil	20.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 g
MgSO ₄	1.0 g
CaCl ₂	0.5 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 liter
pH	9.0

Table 2. The composition of TGY medium for screening

Tryptone	5.0 g
Dextrose	1.0 g
Yeast Extract	5.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Agar	10.0 g
Distilled water	1 liter
pH	9.0

하였다.

효소활성 측정법

Lipase의 활성측정은 권 등(7)의 방법에 따라 측정하였다. 기질제조는 emulsion stock solution[20 mM glycine-NaOH buffer(pH 10.0)에 0.1M NaCl, 20 mM CaCl₂, 1 mM deoxy chloride, 5% gum arabic을 함유]에 5% olive oil을 첨가한 후, Yamada 등(8)의 방법에 따라 homogenizer를 이용하여 18,000 rpm에서 3분간 유회시켜 사용하였으며, 사용하기 직전에 조제하였다. 발색시약(copper reagent)은 Lowry & Tinsley 방법(9)에 의한 5%(w/v) cupric acetate를 조제하여 Whatmann No.1 여과지로 여과한 후 pyridine으로써 pH 6.1로 조정하여 사용하였다. 효소활성측정은 기질 2 ml에 효소액 0.2 ml를 첨가하여 진탕배양수조(130 strokes/min)에서 45°C, 20분간 동안 반응시켰다. 반응후 6N HCl 0.5 ml를 첨가하고 유리 지방산을 용해하기 위하여 isooctane 5.0 ml를 넣어서 혼합한 다음 100°C에서 5분간 처리하였다. 분리한 isooctane층에 발색제인 copper reagent 1.0 ml를 첨가하여 vortex한 후 715 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 효소액과 기질을 넣고 즉시 6N HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 위의 방법으로 행하였으며, 효소 1 unit는 1 분간에 1 μmol의 지방산을 유리하는 효소량으로 하였다. 유리지방산의 정량은 oleic acid를 각각의 농도

Table 3. The composition of Nutrient broth for screening

Olive oil	10.0 ml
Peptone	5.0 g
Beef extract	3.0 g
Distilled water	1 liter
pH	9.0

별로 하여 isooctane 5.0 ml를 첨가한 다음, copper reagent를 첨가하여 발색시켜 715 nm에서 흡광도를 측정하여 유리 지방산의 표준곡선을 작성한 다음, 이로써 시료의 유리 지방산을 정량하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin(Sigma co.)을 표준단백질로 하여 Lowry 등(10)의 방법에 의하여 정량하였다.

배양방법

효소생산배지(1% peptone, 0.5% tryptone, 0.1% yeast extract, 1% Tween 80, 1% soluble starch, 0.05% CaCl₂, 0.05% NaCl, pH 9.0)에서 예비배양한 배양액을 본 배양액의 1%가 되도록 첨가한 후, 진탕배양기에서 200 rpm의 속도로 교반하면서 30°C에서 40시간 진탕배양한 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 30 분)하여 균체를 제거한 상징액을 조효소액으로 사용하였다.

효소의 정제

1/ 배양액을 원심분리하여 상징액을 80% ammonium sulfate로 염색한 후 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전물을 소량의 0.02M Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 용해시킨 뒤, 동일완충액으로 4°C에서 48 시간 동안 투석하였다. 투석후 효소액을 DEAE-Sephadex A-50 column(column size : 3×50 cm, flow rate 38 ml/hr)에 흡착시킨 후 이온강도를 증가시키면서 용출하여 활성부위를 모았다. 활성분획을 다시 Sephadex G-100 column(column size : 2.4×80 cm, flow rate 9 ml/hr)에 넣은 후 0.02M Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 용출하여 활성부위를 모았다.

전기영동

Polyacrylamid disc gel 전기영동은 Davis(11)의 방법에 따라 7.5% polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 후 Amino black 10-B로 염색하고 7% acetic acid로 탈색하였다.

분자량 측정

분자량은 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용한 Laemmli 등(12)의 방법에 따라 12.5% acrylamide gel을 조제하여 정제효소와 표준단백질을 전기영동한 다음 coomassibrilliant blue로 염색하였다. 사용한 표준단백질은 phosphorylase b(M.W. : 97,400), bovine serum albumin(M.W. : 64,000), ovalbumin(M.W. : 45,000), carbonic anhydrase(M.W. : 31,000), soybean trypsin inhibitor(M.W. : 21,500), lysozyme(M.W. : 14,000)을 사용하였다.

아미노산 분석

효소의 아미노산 조성은 산가수분해의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 일정량의 시료에 6N-HCl 용액을 가하고 질소가스로 충전, 밀봉하여 105°C에서 20시간동안 가수분해시킨 다음 감압농축하여 완전히 탈산한 후 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

결과 및 고찰

Alkaline lipase 생산균주의 분리 및 동정

대구지역 일대의 토양과 하천수 및 유지공장의 침적지 토양을 균원시료로 하여 gall power가 함유된 분리용 배지에서 배양하여 주위에 clear zone을 형성하는 colony를 1차 분리하였고, 이들을 rhodeamine

B 함유배지에서 배양하여 orange fluorescent halo zone을 형성하는 15주를 2차 분리하여, 이들을 1% olive oil nutrient broth에서 배양하여 효소활성이 가장 높은 1주를 선별하여 AL-11이라 명명하였다. 분리된 AL-11의 전자현미경 사진을 Fig. 1에 나타내었으며, 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 검토한 결과는 Table 4와 같았다. Alkaline lipase 생산균인 AL-11은 Gram 음성의 단간균이었으며, 운동성이 없고 통성혐기성이었으며 포자는 존재하지 않았다. 또한 citrate 이용시험, gelatin 액화, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase 시험의 결과는 양성이었고, H₂S 음성, oxidase 음성, pigment 음성으로 NO₃으로부터 NO₂를 생성하였고 당이용시험중 lactose와 rhamnose는 이용하지 않았다. 이상과 같은 AL-11의 특성은 *Serratia liquefaciens*와 거의 일치하므로 *Serratia liquefaciens* AL-11로 명명하였다.

효소생성을 위한 최적조건

질소원의 영향 본 균의 증식과 alkaline lipase 생성에 미치는 질소원의 영향을 조사한 결과 Table 5에서와 같이 무기질소원에서는 이 효소를 생성하지 못하였으나, 유기질소원인 peptone 1.0%와 tryptone 0.5%를 함께 첨가하였을 때 효소생성이 높았다.

탄소원의 영향 이 효소의 생성에 미치는 탄소원 영향을 조사한 결과 Table 5와 같이 1% soluble starch를 사용하였을 때 효소생성이 가장 높았으며, fructose, galactose, lactose 등을 사용하였을 때 효소생성이 저해되었다. Soluble starch는 동정실험에서 가수분해를 일으키지 않는 것으로 나타나 모순점을 보였으나 이는 soluble starch 대신에 유기질소원으로 사용한 peptone과 tryptone에 존재하는 탄소원을 이용하기 때문이며 이와 유사한 결과(13, 14)도 보고되어 있다.

무기염류의 영향 무기염류가 lipase 생성에 미치는 영향을 본 결과 Ca²⁺와 Fe²⁺에 의해 효소생성능이 향상되었으며, Zn²⁺ 첨가시 상대효소활성은 25.1%로 효소생성이 억제되었다(Table 5). 또한 알칼리성 효소 생산시 최적 배지조성에 K₂HPO₄를 첨가하여 일정한 pH를 유지하므로써 효소활성을 유지하려고 하는데, 본 균의 배양시 K₂HPO₄를 첨가하지 않았을 때 균의 증식 및 효소생성능이 높았다.

배양시간에 따른 효소 생산 효소생성을 위한 최적배지, 최적배양조건에서 배양시간에 따른 균의 증식과 효소생성능을 조사한 결과, Fig. 2에서와 같이 배양 42시간에 최대에 도달하였으며 48시간이 지나면서 부터 효소실활이 관찰되었다. 초기 pH의 영향

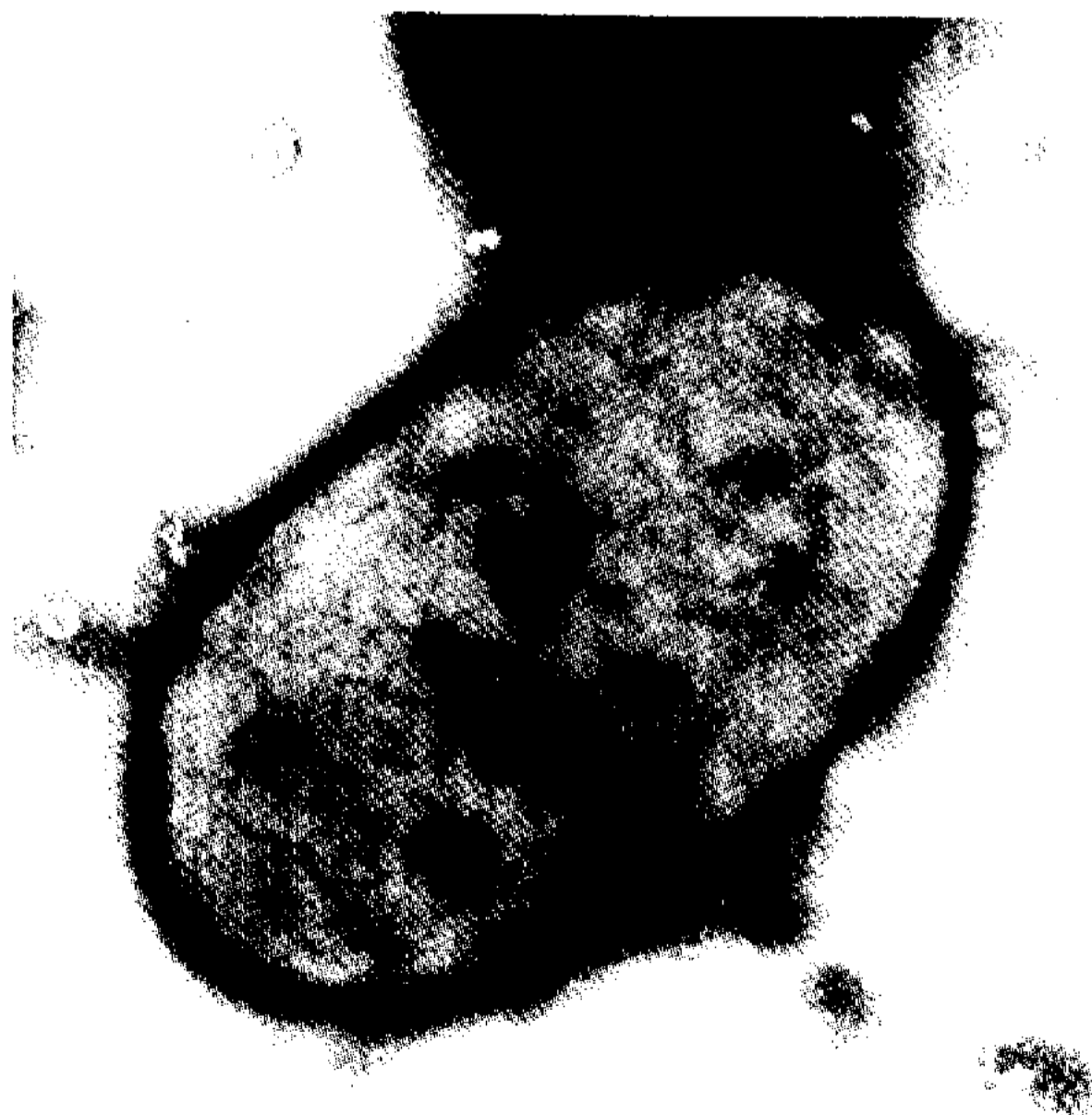


Fig. 1. Transmission electron micrograph of the strain AL-11 (×40,000).

Table 4. Morphological and physiological characteristics of the strain AL-11

1. Morphological characteristics	
Gram staining	Negative
Shape	Short rod
Cell size	0.6×1.2 μm
Motility	Immotile
Flagella	Negative
Spore staining	Negative
2. Culture characteristics	
Colony on nutrient agar (30°C, 1~2 days);	
Form	Circular
Surface	Smooth
Elevation	Convex
Edge	Undulate
Opacity	Translucent
Color	Yellowish white
Nutrient broth (30°C, 1~2 days);	
Turbid with pellicle and sediment	
3. Physiological characteristics	
Temperature range for growth	4~40°C
pH range for growth	5.0~11.0
Catalase	positive
Oxidase	negative
Urease	negative
Arginine dihydrolase	negative
Lysine dihydrolase	positive
Ornithine dihydrolase	positive
Starch hydrolase	negative
Gelatin liquefaction	positive
Casein hydrolysis	positive
Tributylin hydrolysis	positive
ONPG	negative
O/F test	fermentative
H ₂ S production	negative
Indol production	negative
Methyl red test	negative
Voges-Proskauer test	negative
Citrate utilization	positive
Fluorescent pigment	negative
Nitrate reduction	positive
Denitrification	negative
Utilization of Carbohydrates	
Glucose, Sucrose, Mannitol	positive
Fructose, Galactose, Maltose, Raffinose Melibiose, Cellibiose, Xylose, Arabinose	
Glycerol Sorbitol, Inositol, Lactose, Rhanose	negative

Table 5. Effect of various sources on alkaline lipase production

Source	Component	Relative activity (%)	
Control	None	100.0	
	Peptone	41.2	
	Tryptone	64.4	
	Organce	Soytone	29.1
	nitrogen (1.0%, w/v)	Yeast Ext.	28.5
	Nutrient broth	45.7	
	Peptone + Tryptone	100.0	
	Soytone + Peptone	29.1	
	Carbon (1.0%, w/v)	Galactose	44.0
		Glycerol	97.6
Lactose		52.6	
Glucose		70.6	
Fructose		37.3	
Sucrose		63.6	
Na-acetate		72.8	
Na-citrate		84.7	
Soluble starch		111.3	
Inorganic salt (1.0%, w/v)		MgSO ₄	103.9
	MgCl ₂	110.4	
	MnSO ₄	99.2	
	MnCl ₂	108.5	
	FeSO ₄	122.5	
	FeCl ₂	118.4	
	CuSO ₄	124.1	
	CaCl ₂	132.7	
	ZnSO ₄	25.1	
	BaCl ₂	110.4	
CoCl ₃	07.0		

Cultivation was carried out for 40 hours at 30°C in the medium containing 1.0% peptone, 1.0% tryptone, 0.1% yeast ext., 1.0% soluble starch, 0.05% CaCl₂, 0.05% NaCl, pH 9.0.

본 균의 증식과 효소생성에 미치는 초기 pH 영향을 조사한 결과, Fig. 3에서와 같이 효소생성은 pH 6~9에서 높게 나타났다. 이 균주는 효소생성에 있어서도 초기의 pH는 별로 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.

Alkaline lipase의 정제

염석과 투석 조효소액에 황산암모늄을 첨가하여 80%로 포화시킨 다음 4°C에서 12시간 정지하여 효소단백질을 응집 침전시킨 다음 8,000 rpm에서 30분

간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 분리된 침전 단백질은 소량의 0.05M Tris-NaOH buffer(pH 8.0)로 용해시킨 다음 48시간 동안 동일 완충액으로 투석시켰다. 이 때 잔존하는 불용성 물질은 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 제거한 다음 동결건조하였다. 그 결과 정제도 1.66배, 수율 90%, 비활성도 5.10

unit/mg으로 효소를 정제할 수 있었다(Table 6).

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography
동결건조한 효소를 소량의 완충액에 녹이고 효소액을 DEAE-Sephadex A-50 column(3×50 cm)에 주입한 다음 약 1.5배의 0.02M tris-HCl buffer(pH 8.0)로 비활성 단백질을 제거하고 흡착된 단백질을 0~1.0 M NaCl의 linear salt gradient로 용출시켰다(Fig. 4). 이때 유속은 38 ml/hour였고 10 ml씩 분획하여 활성분획만 모아서 동결건조하였다. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography 한 결과 약 0.8M NaCl 정도에서 활성단백질이 용출되었으며 수율 73.65%, 정제도는 4.95배, 비활성도는 15.22 unit/mg으로 효소를 정제할 수 있었다(Table 6).

Sephadex G-100 gel filtration DEAE-Sephadex A-50에 의해 분리된 활성분획을 농축하여 Sephadex G-100 column(2.4×80 cm)에 주입하고 9 ml/hour의 유속으로 7 ml씩 분획한 결과 Fig. 5와 같이 3개의 단백질 peak가 나타났으며 이중 28~42번 분획에서 효소활성이 나타났고 분리된 활성분획은 모아서 동결건조하였다. 이 때 수율은 61.3%였고 정제도는 8.80배 비활성도는 27.01 unit/mg으로 효소가 정제되었다. 이상의 정제과정을 요약하면 Table 6과 같다.

Polyacrylamide gel electrophoresis 위에서 정제

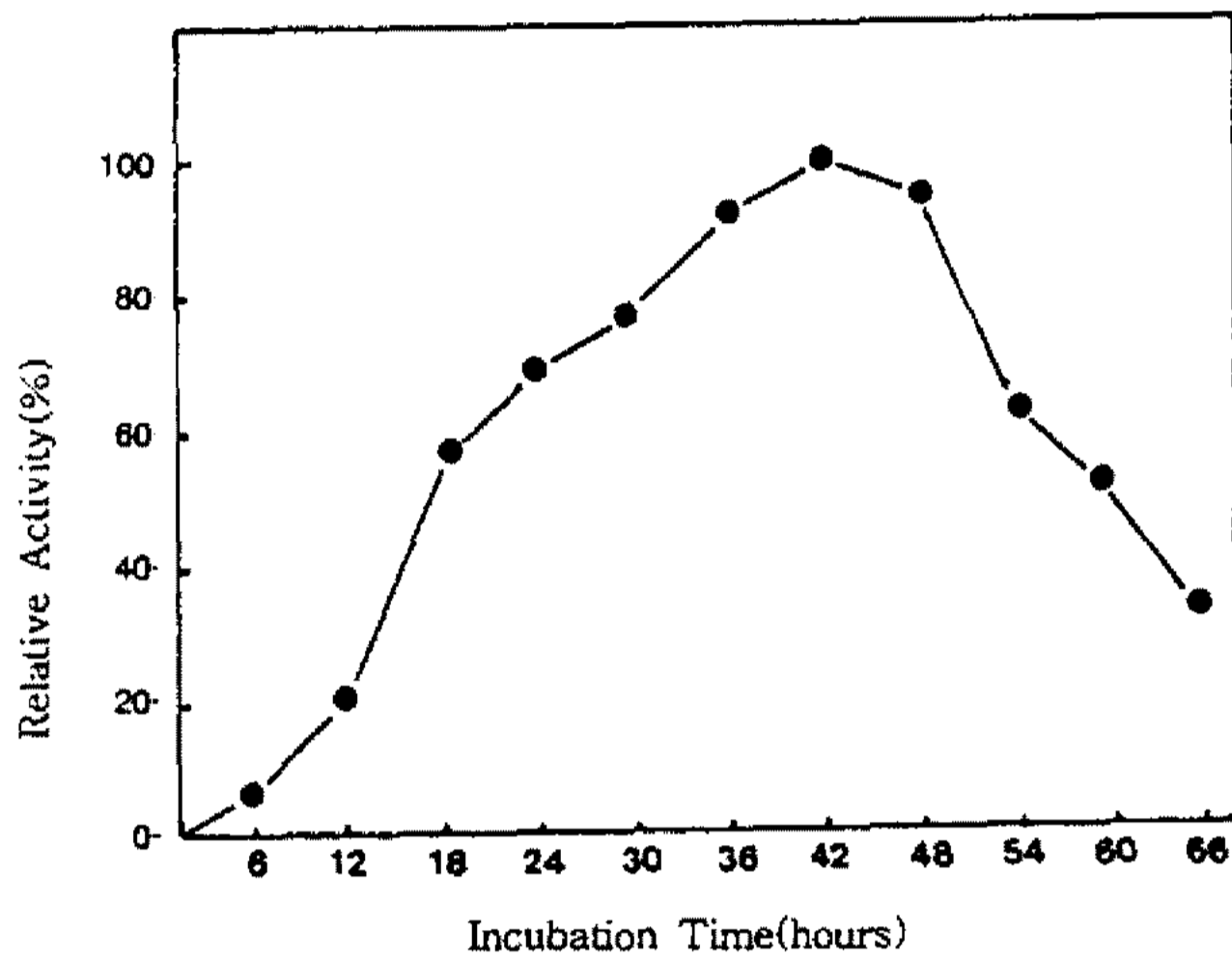


Fig. 2. The profile of the alkaline lipase production during cultivation in the shaking culture.

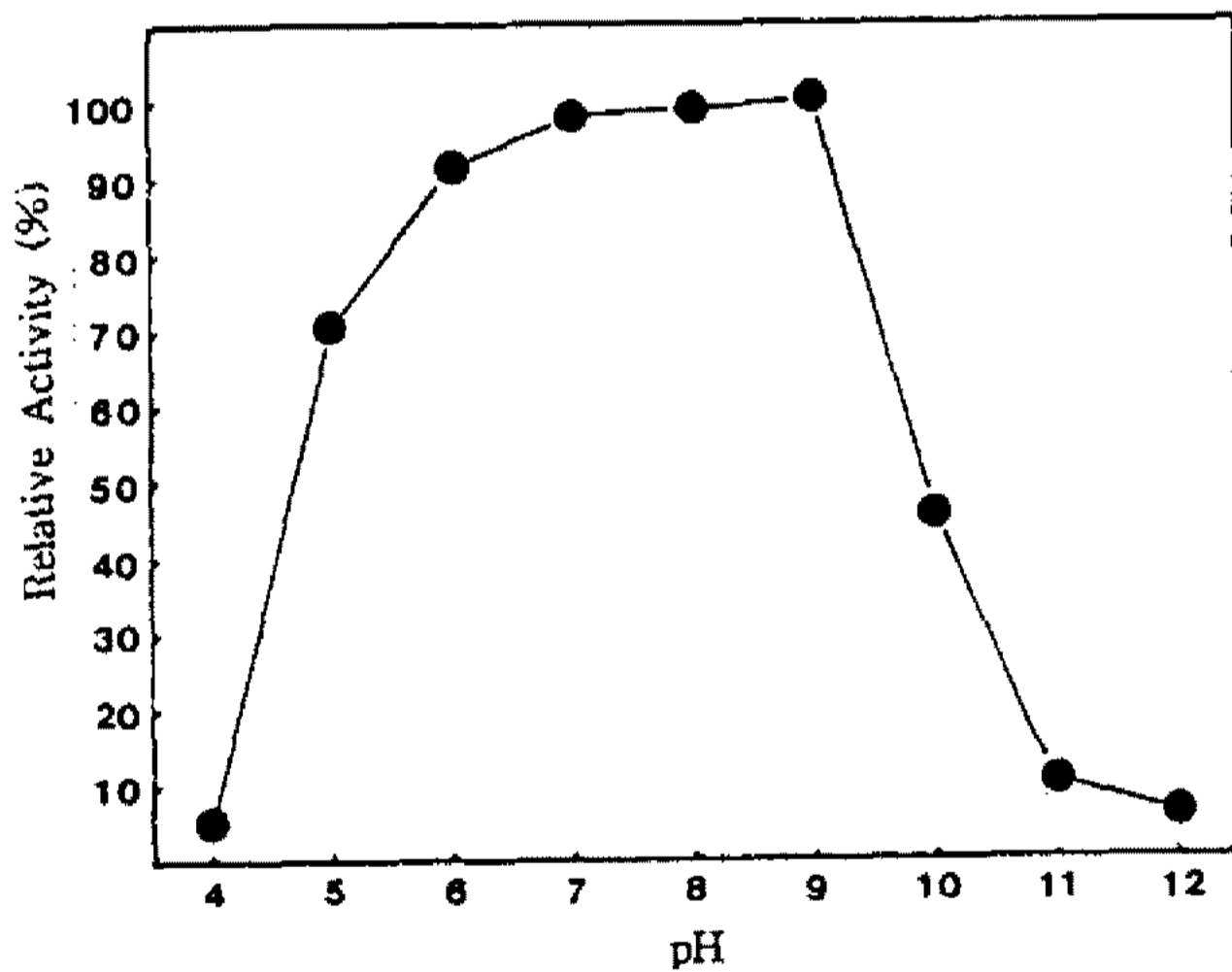


Fig. 3. Effect of initial pH on activity of alkaline lipase from *Serratia* sp. AL-11.

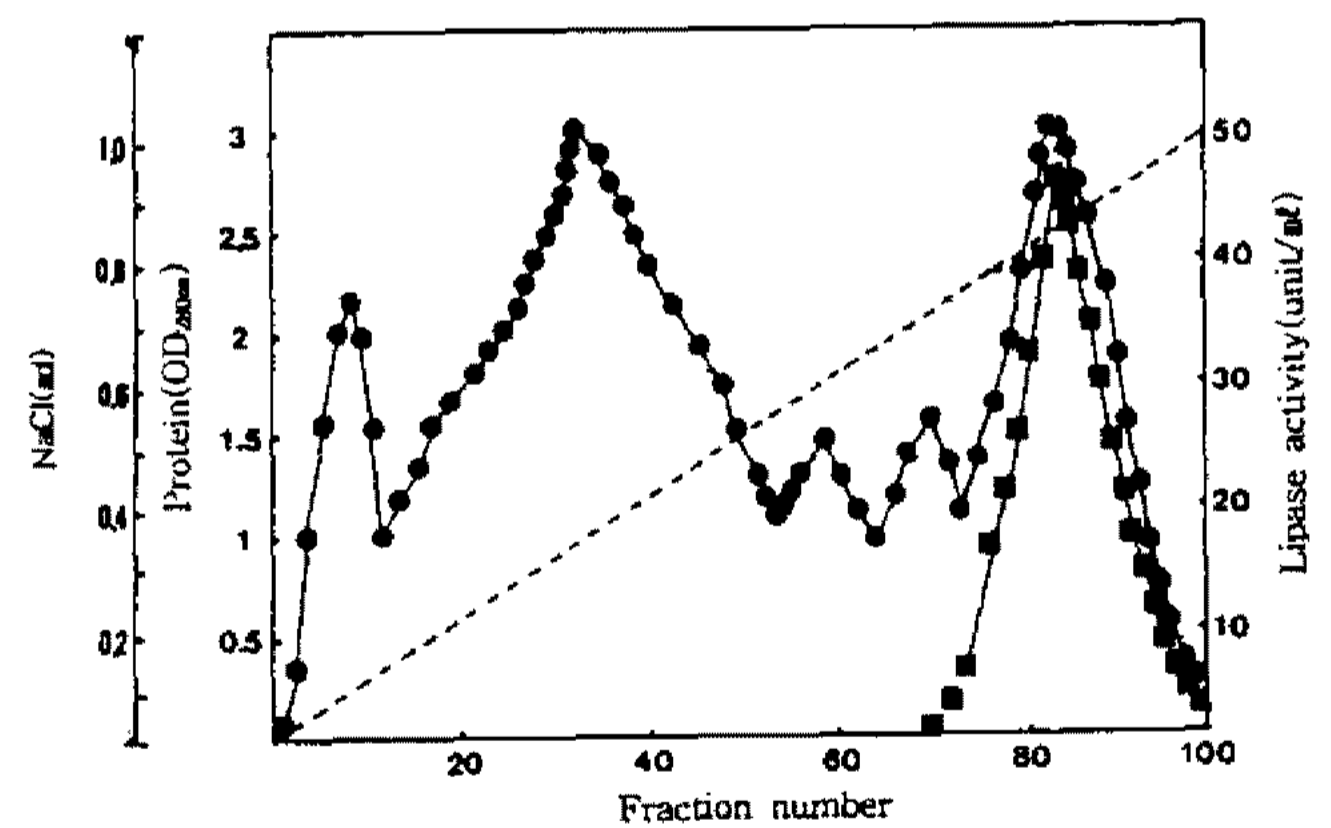


Fig. 4. DEAE-sephadex A-50 column chromatography of alkaline lipase from *Serratia* sp. AL-11.
●---● protein, ■---■ enzyme activity

Table 6. Purification of the alkaline lipase from *Serratia* sp. AL-11

Steps	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude enzyme solution	3,100	9,517	3.07	100	1.00
80% saturated (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	1,695	8,644	5.10	90	1.66
DEAE-Sephadex A-50	460	7,000	15.22	73.6	4.95
Sephadex G-100	216	5,835	27.01	61.3	8.80

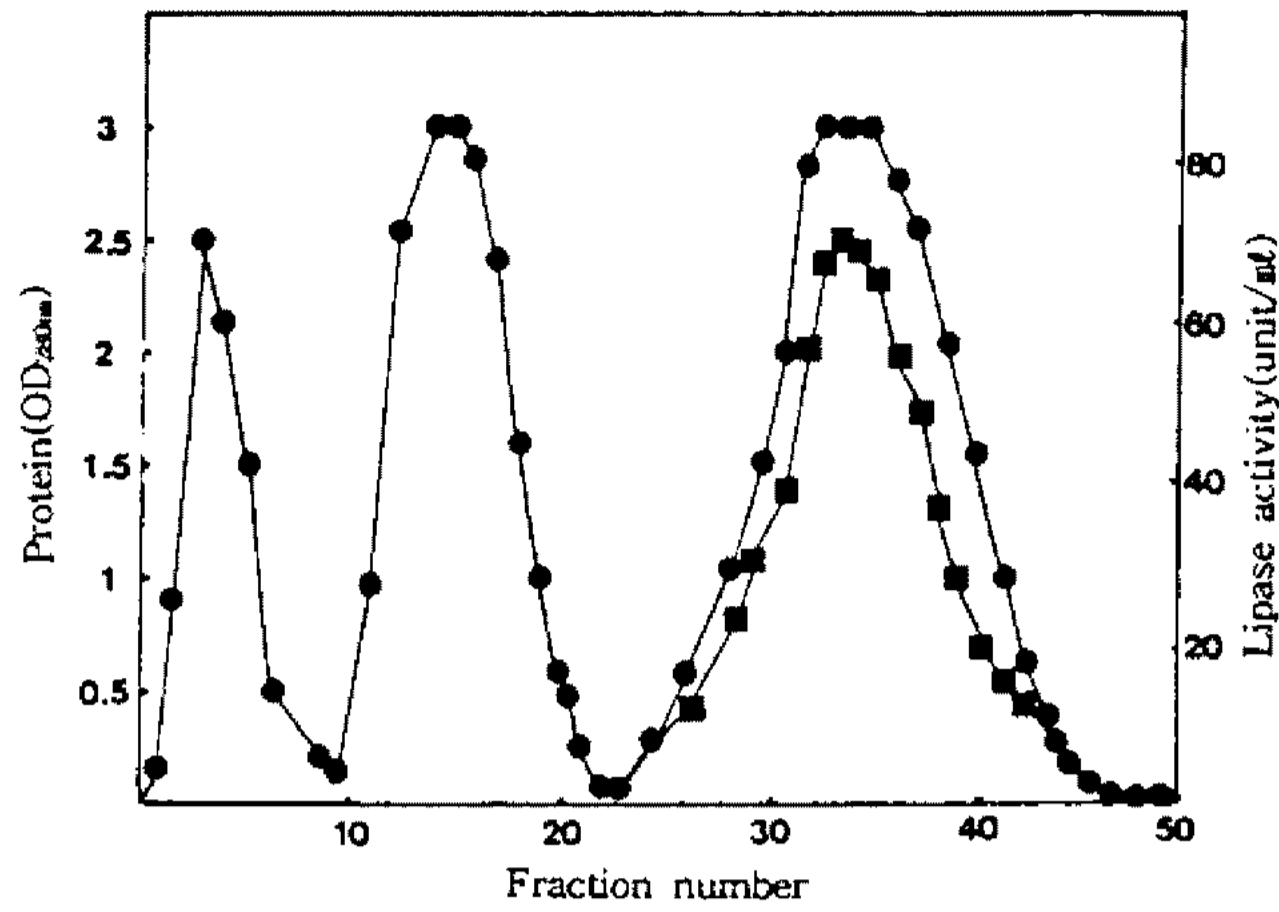


Fig. 5. Sephadex G-100 gel filtration of alkaline lipase from *Serratia* sp. AL-11.
●---● protein, ■---■ enzyme activity

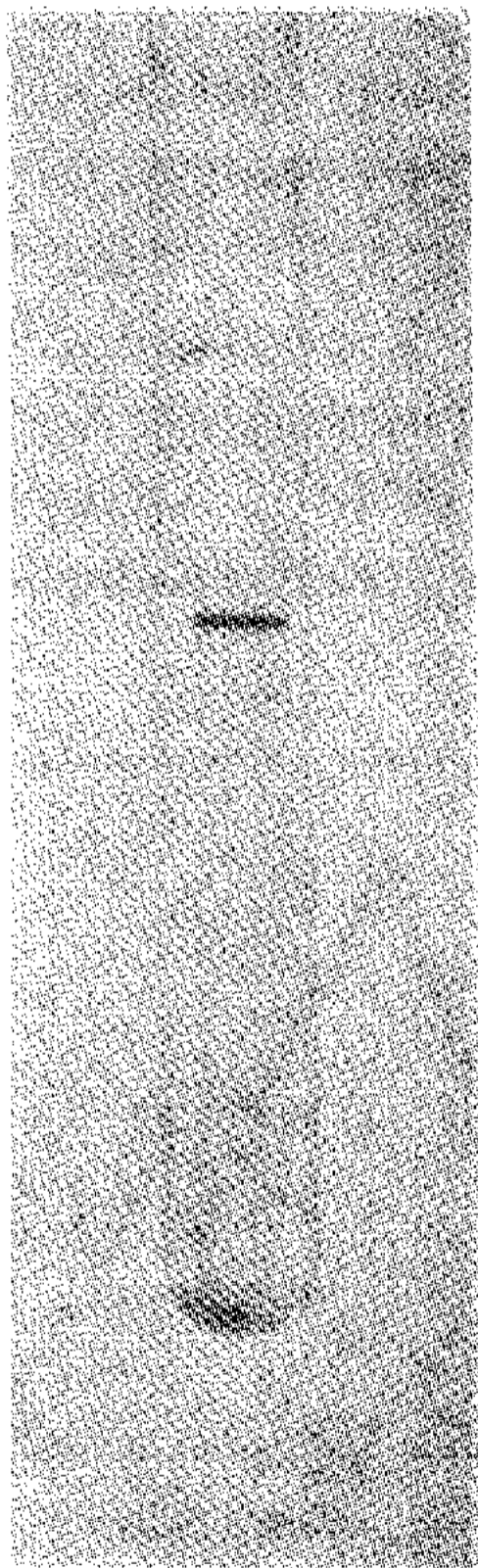


Fig. 6. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified lipase.

된 lipase를 Davis법(11)에 따라 polyacrylamide gel disc 전기영동을 실시한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 전기 영동상의 단일밴드를 나타냄으로서 단일 단백질이라는 결과를 얻었다.

효소의 분자량 Laemmli 등(12)의 방법에 따라 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의한 분자량 측정 결과는 Fig. 7에 나타난 바와 같이 53,000 정도이었다.

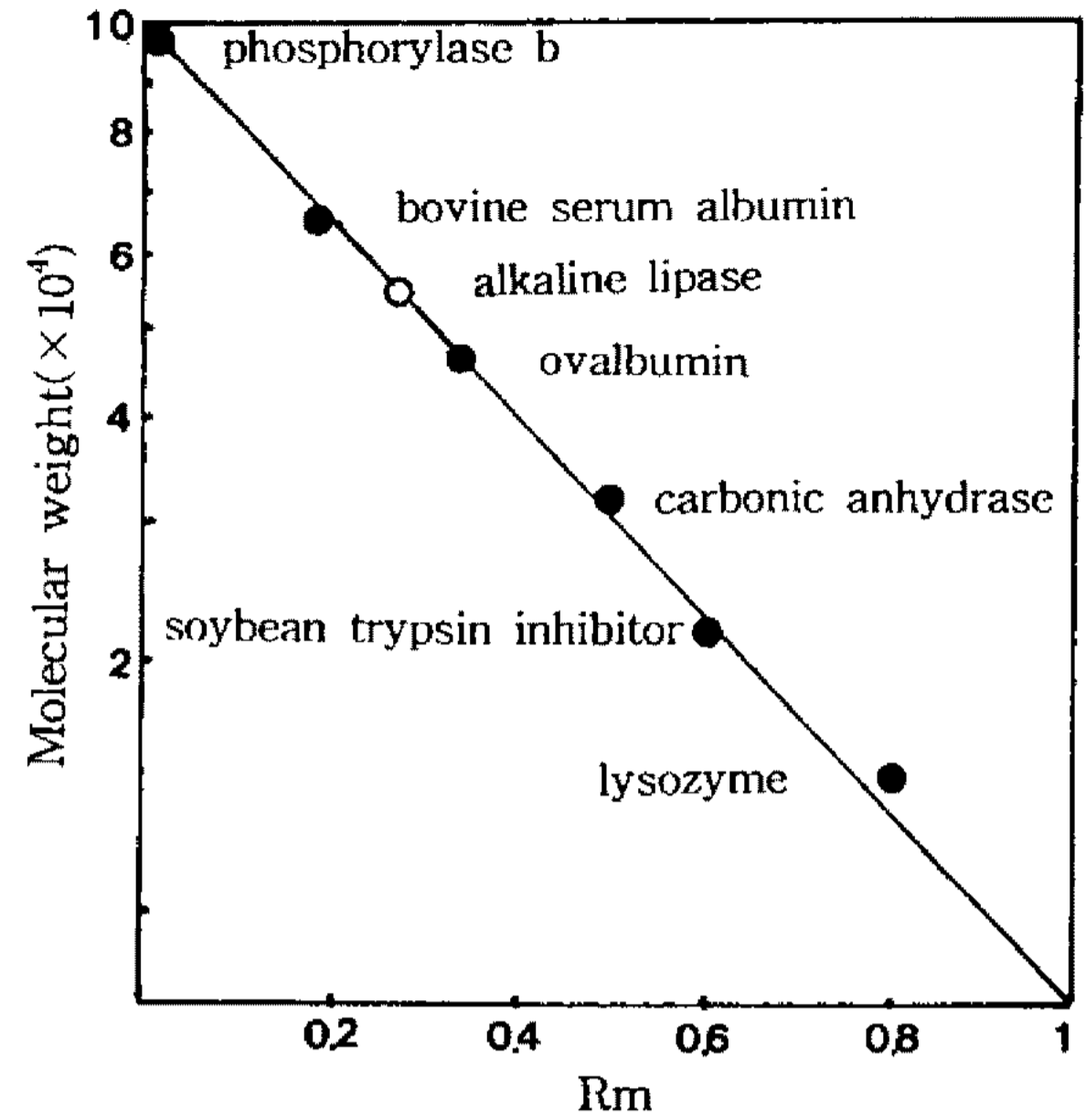


Fig. 7. The calibration curve for determination of the molecular weight of alkaline lipase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Table 7. Amino acid composition of alkaline lipase from *Serratia* sp. AL-11

Amino acid	Content (mg/g)
Aspartic acid	89.7
Threonine	27.3
Serine	67.2
Glutamic acid	137.1
Proline	164.5
Glycine	206.9
Alanine	95.8
Cysteine	trace
Valine	35.0
Methionine	trace
Isoleucine	30.5
Leucine	0.0
Tyrosine	9.5
Phenylalanine	18.2
Histidine	4.0
Lysine	44.9
Arginine	14.5

효소단백질의 아미노산 조성 정제효소의 아미노산 조성은 Table 7에서 보는 바와 같이 17종류로써 glycine과 proline, glutamic acid가 각각 그램당 206.9 mg, 164.5 mg, 137.1 mg으로 가장 많이 함유되었고 histidine과 arginine의 함유량이 가장 적게 나타났으며, 이는 Tsujisaka 등(15)이 보고한 *G. candidum* lipase의 아미노산 조성과의 비스듬한 양상을 보였다.

요 약

본 실험에서 토양으로 부터 분리한 지방분해효소 생산균은 형태학적, 생화학적, 생리학적 특성을 조사한 결과 장내세균과의 그램 음성 단간균인 *Serratia liquefaciens*로 밝혀졌다. 이 균주의 최적배양 및 최적효소생산조건을 조사한 결과, 1.0% peptone, 0.5% tryptone, 0.1% yeast extract, 1.0% soluble starch, 0.05% CaCl₂, 0.05% NaCl(pH 9.0)의 배지조성에서 30°C, 40~45시간 배양시 효소활성이 가장 높았다. 황산암모늄 염석, DEAE-Sephadex A-50 ion-exchange chromatography 및 Sephadex G-100을 이용한 겔여과법에 의해 비활성도 27.01 unit/mg, 정제배수 8.8배로 효소를 정제하였으며, polyacrylamide gel disc electrophoresis에 의하여 단일 단백질임을 확인하였다. 정제효소의 분자량은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의하여 분자량 53,000 정도의 monomer로 추정되었고, 아미노산조성은 17종류로써 glycine과 proline, glutamic acid 함량이 많았다.

감사의 글

이 논문은 1995학년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Brockenhoff, H. and Robert G. Jensen. 1974. Lipolytic Enzymes. Academic Press, New York. p. 139
2. Kokusho, Y., H. Machida and S. Iwasaki. 1982. Production and properties of alkaline lipase from *Alcaligenes* sp. Strain No. 679. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1743-1750.
3. Iizumi, T., K. Nakamura and T. Fukase. 1990. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1253-1258.
4. Hou, C.T. and T.M. Johnston. 1992. Screening of lipase activities with cultures from the agricultural research service culture collection. *JAACS* **69**: 1088-1097.
5. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th Ed., Williams & Wilkins, Baltimore.
6. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins.
7. Kwon, D.Y. and J.S. Rhee. 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *JAACS* **63**: 89-92.
8. Yamada, K., Y. Ota and H. Machida. 1962. Studies on the production of lipase by microorganism. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **36**: 860-864.
9. Lowry, R.R. and I.J. Tinsley. 1975. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **53**: 470-472.
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
11. Davis, B.J. 1964. Disc gel electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 404.
12. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
13. Lee, J., R. Kim, B. Kim, Y. Park and I. Jin. 1993. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain producing an extracellular alkaline lipase catabolically regulated by glucose, and purification of the lipase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **21**: 239-246.
14. 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. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1353-1358.
15. Tsujisaka, Y., M. Iwai, J. Fukumoto and Y. Okamoto. 1973. Induced formation of lipase by *Geotrichum*. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 837-842.

(Received 25 October 1995)