

Arthrobacter sp. A-6에 의한 Inulin Fructotransferase (depolymerizing)의 생산

박정복 · 권영만 · 최용진*
고려대학교 자연자원대학 유전공학과

Production of Inulin Fructotransferase(depolymerizing) by *Arthrobacter* sp. A-6

Jeong-Bok Park, Young-Man Kwon and Yong-Jin Choi*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Resources
Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — A bacterial strain A-6 producing the high level of an extracellular inulin fructotransferase(depolymerizing)(EC 2.4.1.93) which converts inulin into di-D-fructofuranose dianhydride III (DFAIII) was isolated from soil. The isolated strain could be classified as a species belonging to the genus *Arthrobacter* based on its morphological and physiological characteristics identified in this work. Production of the enzyme was induced by inulin, and the highest activity was detected in the slightly acidic medium supplemented with 2.5% inulin and 0.1% trypton as a sole carbon and a nitrogen source, respectively. Under the optimal conditions, the enzyme activity in the culture supernatant reached approximately 60 units/ml after 96 hours of cultivation. The optimum pH and temperature for the crude enzyme preparation from *Arthrobacter* sp. A-6 were pH 5.0 and 60°C, respectively. The DFA produced by the action of the inulin fructotransferase was confirmed to be DFAIII by paper chromatography, HPLC and ¹³C-NMR spectroscopy.

Inulin은 30-35 단위의 D-fructose가 β -2,1 결합에 의해 직쇄상으로 중합되어 있는 말단에 D-glucose 한 분자가 α -2,1 결합으로 부착되어 있는 구조를 가진 곡과 식물 괴근의 저장 탄수화물이다. 이와 같이 일종의 polyfructan으로서의 inulin은 작용 효소의 종류에 따라 D-fructose는 물론이고 각 종의 inulooligosaccharide, Di-D-fructofuranose-dianhydrides(DFA) 및 cyclo fructan 등 다양한 종류의 감미료로 전환될 수 있다.

한편 괴근의 약 80%(건물량)가 inulin으로 구성되어 있어 inulin의 주 공급원이 되고 있는 돼지감자(Jerusalem artichoke)는 다른 일반 작물에 비해 기후나 토질에 큰 영향을 받지 않아 재배가 용이할 뿐만 아니라 단위 면적당 생산량도 약 60 t/ha에 이른다고 보고되고 있다. 따라서 감미 자원이 전무한 우리나라로서는 inulin은 적극적 활용을 위한 연구 개발 노력에 따라 매우 중요한 잠재 감미 자원이 될 수

있다고 판단된다.

더욱이 상기 분해 산물 중에서 DFA는 원래 inulin의 산 가수분해 산물중에서 발견되었으나 1972년 *Arthrobacter ureafaciens*(1)에서 Inulin fructotransferase(depolymerizing)(EC 2.4.1.93)가 발견된 이래 현재까지 *Arthrobacter globiformis* C11-1(2), *Arthrobacter ilicis* OKU17B(3), *Arthrobacter* sp. H65-7(4), *Enterobacter* sp. S45(17) 등에서 di-D-fructofuranose-1,2':2,3'-dianhydride(DFAIII)를 생성하는 효소가 보고되었다. 이 외에도 미생물 효소에 의해 생산되는 di-D-fructofuranose-1,2':2,1'-dianhydride(DFAI)과 di-D-fructofuranose-2,6':1,2'-dianhydride(DFAV) 등이 inulin 분해 산물로 보고되고 있다(5-8, 14).

DFAIII는 매우 안정한 화합물로 감미도는 설탕에 비해 약 반 정도이나 쓴맛이 없고 체내에서 insulin에 관계없이 흡수되는 저칼로리 당으로서 장내 Bifido bacterium의 증식을 촉진하여 각종 성인병 예방에 크게 도움이 되는 여러가지 생리 효과를 가져옴과 동시에 충치 예방 효과도 예상되는 새로운 타입의 우수 감미료로 기대되고 있다(9-11).

Key words: DFAIII, Inulin Fructotransferase, *Arthrobacter* sp. A-6

*Corresponding author

본 연구실에서는 inulin의 효소 분해에 의한 fructose 생산과 관련된 다년간의 연구를 수행해 오던 중 극히 높은 수준의 세포외 inulin fructotransferase 생산, inulin을 효율적으로 다량의 DFAIII로 전환시키는 우수 균주를 토양으로부터 분리하고 그 결과의 일부를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 시약

본 연구에서 사용한 inulin은 dahalia tuber에서 추출된 Sigma 사 제품이었으며 DFAIII 표품은 서울대학교 김수일 교수로부터 제공받았다. 기타 일반 시약은 시판 1급 이상의 분석용 시약을 구입, 사용하였다.

균주 분리

분리 배지 균주 분리에 사용한 배지는 Yokota(4) 등이 사용한 배지를 약간 변경시킨 것으로 다음과 같은 조성을 가지고 있었다. 배지 1 liter 중에는 20.0 g inulin, 1.4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 g KH_2PO_4 , 0.3 g CaCl_2 , 0.3 g urea, 0.3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.0 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.6 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.4 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.0 mg CoCl_2 , 1.0 g polypepton, 2.0 g Tween 80 및 15 g의 agar가 포함되어 있으며 초기 pH는 5.2였다.

균주 선별 토양 시료 현탁액 0.1~0.2 ml를 분리용 배지에 도말 접종하고 37°C에서 4일간 배양했을 때 inulin 분해에 의해 colony 주위에 형성되는 투명환을 기준으로 하여 1차 선별하였다. 1차 선별한 inulin 분해 균주는 순수 분리 후 분리용 액체 배지에서 24시간 배양하여 조효소액을 얻고 이 조효소액을 이용하여 inulin을 분해, 이때 생성되는 DFA를 paper chromatography로 분석하는 과정을 2차에 걸쳐 반복 실시하여 생산 DFA의 종류 확인과 동시에 DFA 생산량을 분석 비교하여 최종 균주를 선별하였다.

균주 동정

최종 선별한 DFA 생산균은 'Methods for General and Molecular Biology' (18)와 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology' (12)에 기술되어 있는 일반 세균 동정과 관련된 각종 실험을 실시하여 동정하였다. 또한 세포의 전자 현미경 촬영은 균체를 0.2% phosphotungstic acid(pH 6.5)로 고정하여 JEM 100 cx-II로 촬영하였다.

균체중식 측정

배양 과정중의 균체 중식도는 590 nm에서의 O.D로 표시하였다.

조효소액의 조제 및 활성 측정

적절한 조성의 액체 배지에서 37°C, 48시간 진탕 배양한 균주 배양액을 원심분리하여(10000 g, 15 min) 균체를 제거해서 얻은 분리 상층액을 조효소액으로 사용하였다. 효소 활성 측정은 5% inulin 용액 0.5 ml, 0.1 M Sodium citrate 완충용액(pH 5.5) 0.4 ml 및 조효소액 0.1 ml의 총 1.0 ml의 반응액을 60°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 DFA를 HPLC로 분석하여 효소 활성을 산출하였으며 상기 조건 하에서 1분에 1 mole의 DFA를 생산하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

DFA의 생산과 분리

효소액에 동량의 5% inulin 완충용액(0.1 M Sodium citrate buffer; pH 5.5)을 첨가하고 60°C에서 4시간 반응시켰다. 반응이 끝난 반응액은 감압 증류하여 약 1/5 정도로 농축시킨 다음 Bio-gel P2 column (20×1500 mm)에 주입시키고 증류수(6 ml/1 hr)로 용출, 1차로 당 함량이 많은 활성분획(5.0 ml 분획)을 선별한 다음 paper chromatography에 의해 DFA를 확인하는 과정을 거쳐 분리하였다.

Inulin 분해 산물의 분석

Paper chromatography n-butanol : pyridine : water(3 : 2 : 2)의 혼합용매를 사용하여 전개하였으며 resorcinol·HCl로 발색시켰다(19).

HPLC Waters' carbohydrate column(3.9×300 mm), RI detector, acetonitrile : water(70 : 30) 전개용매, 그리고 1.0 ml/min 유속 등의 조건하에서 분석하였다.

NMR 분석 ^{13}C -NMR spectrum은 Varian unit 300 spectrophotometer, 내부 표준 물질로 1,4-dioxane, 그리고 용매는 D_2O 를 사용하여 분석하였다.

총당정량 0.2% orcinol이 함유된 conc- H_2SO_4 로 가수분해 시킨 다음 80°C에서 10분간 가열한 후 420 nm에서 O.D를 측정하여 총당을 정량하는 Anthrone 법(13)을 이용하였다.

결과 및 고찰

균주 분리 및 동정

서울 및 경기 일원으로부터 채취한 약 100여점의 토양 시료로부터 colony 주위에 투명환을 형성하는

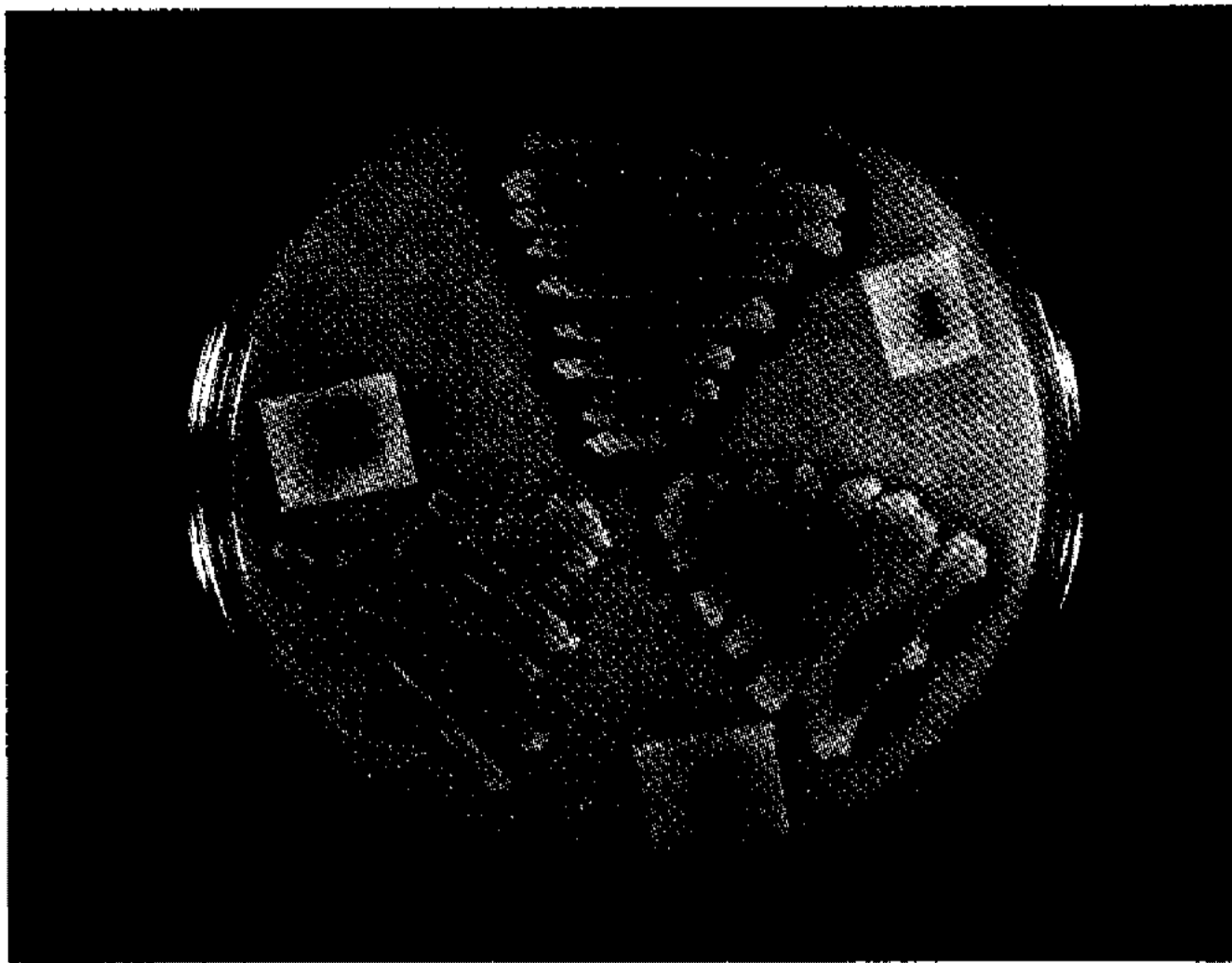


Fig. 1. Clear zone formation by the isolated strains. I: *Arthrobacter* sp. A-6, II: J-7, III: H-11

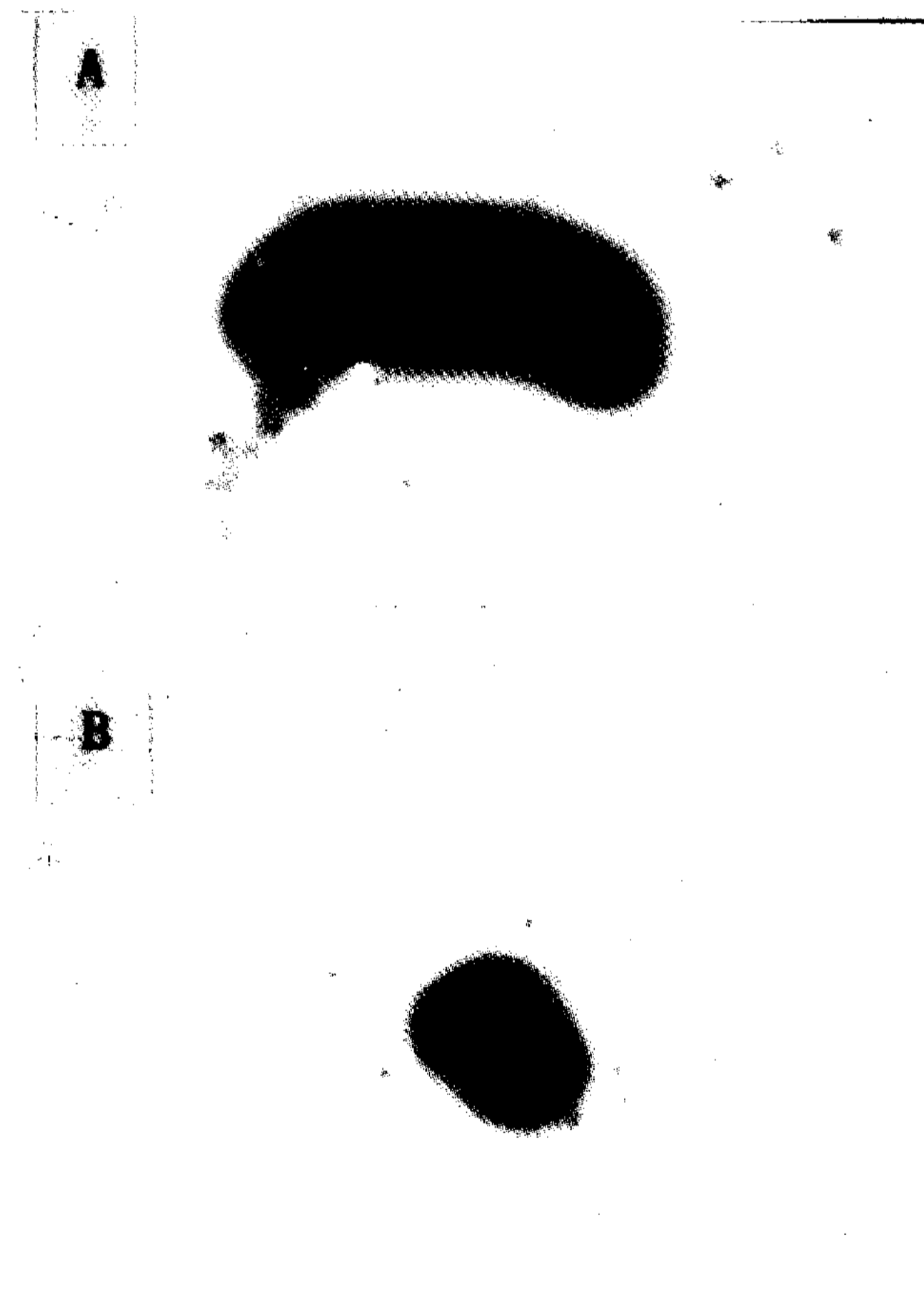


Fig. 2. Electron photomicrographs of *Arthrobacter* sp. A-6.

A: Cells from the young culture
B: Cells from the old culture

60여 균주를 1차 선별하고 생산 효소에 의한 inulin 분해로 생성되는 DFA를 paper chromatography로 분석하였다. 그 결과 1차 선별균 전부가 동일형의

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the isolated strain A-6

Factor	Characteristics
Type and Size	Young culture: Rod ($1.5 \times 0.4 \mu\text{m}$) Old culture: Ovoid ($0.7 \times 0.6 \mu\text{m}$)
Gram staining	positive
Motility	negative
Endospore	not forming
Mycelium	not forming
Colonies on agar plate	circular
Oxygen requirement	positive
Catalase production	positive
Methyl red test	negative
Oxidase test	negative
H ₂ S production	negative
Gelatin liquifaction	weak positive
Nitrate reduction	negative
Citrate utilization	negative
Indole production	negative
Urease	positive
Acetoin production	positive

DFA를 생산하는 것을 확인하였다. 따라서 DFA 생산량을 비교하여 생산량이 높았던 9균주를 선택, 2차와 같은 선별 과정을 한 차례 더 실시해서 DFA 생산량이 가장 높다고 판단된 A-6 균주를 최종 선별하여 이하 실험의 공시 균주로 사용하였다.

최종 선별한 A-6 균주는 inulin 배지에서 크고 뚜렷한 투명대를 형성하였으며(Fig. 1 참조) 대수 증식기의 세포는 $1.5 \times 0.4 \mu\text{m}$ 의 단간균의 형태였으나 정체기의 세포는 $0.7 \times 0.6 \mu\text{m}$ 의 구형에 가까운 형태로 배양 시간에 따른 세포 형태의 뚜렷한 변화를 보였다(Fig. 2 참조).

또한 A-6 균주는 그람 양성균으로서 운동성이 없고 포자 및 균사체를 형성하지 않으며 catalase 양성반응을 나타내는 등 *Arthrobacter* 속 세균의 주요 특성을 그대로 나타내었으며 Table 1에 표시되어 있는 기타 동정과 관련된 시험 결과를 종합 분석하여 *Arthrobacter* 속의 세균으로 최종 분류하고 *Arthrobacter* sp. A-6로 명명하였다.

DFA의 동정

Arthrobacter sp. A-6를 37°C에서 48시간 진탕 배양하여 얻은 조효소액 200 ml를 이용, 방법란에 상세한 과정에 따라 inulin을 분해, DFA를 생산하고 정제 분리한 다음 paper chromatography(Fig. 3 참조),

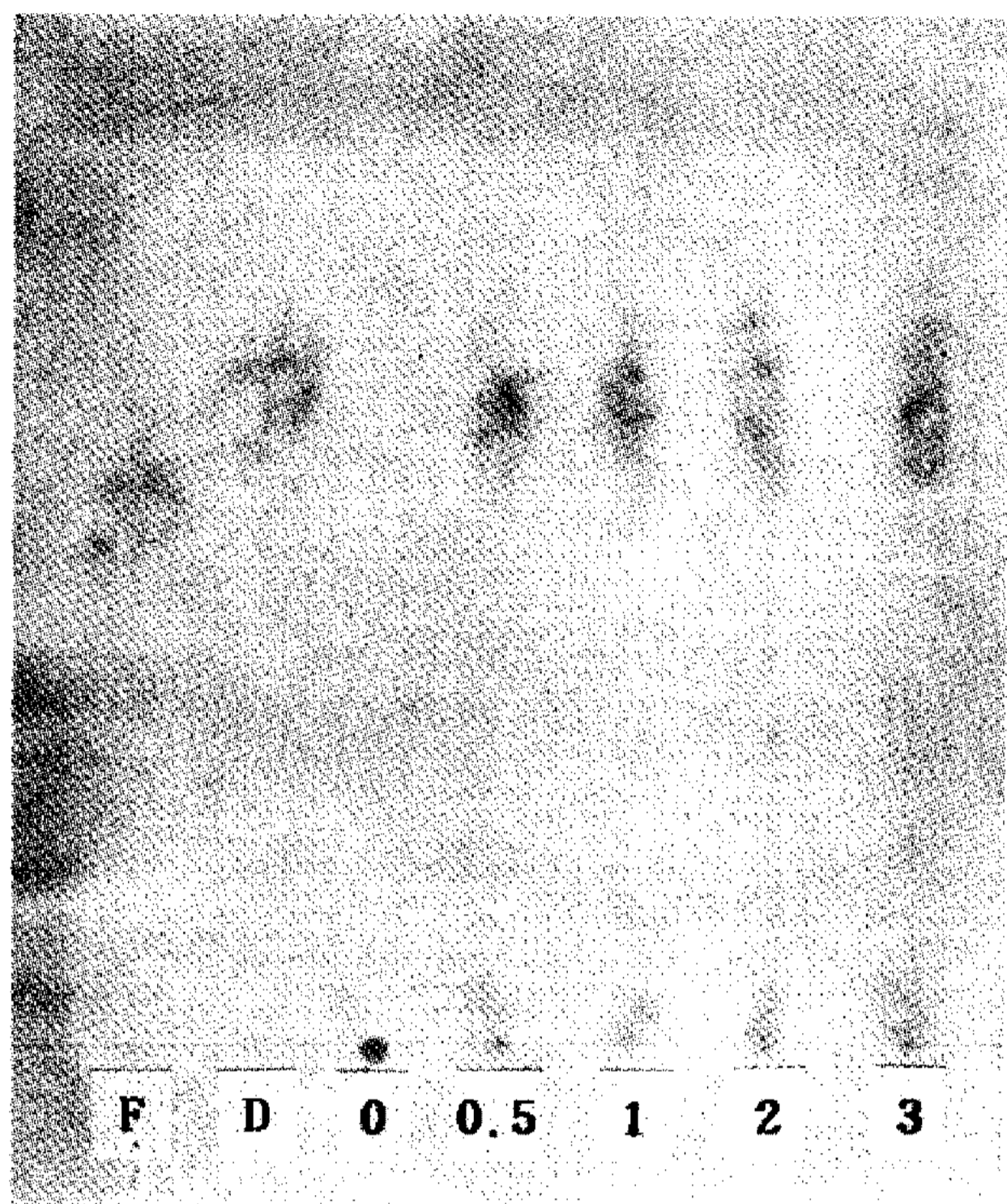


Fig. 3. Paper chromatogram of the inulin hydrolysate from the reaction with the crude enzyme preparation. F: Fructose, III: DFAIII, 0, 0.5, 1, 2, 3: Reaction time (hr)

HPLC(Fig. 4 참조) 및 ¹³C-NMR 분석(Table 2 참조) 등을 실시해 본 결과 본 합성 DFA는 Rf 값 0.73, retention time 5.9 min, 그리고 ¹³C-NMR 분석에 의한 chemical shift 등 모든 분석 자료가 DFAIII 표준품과 완전 일치되었다. 따라서 *Arthrobacter* sp. A-6 토양 분리균은 DFAIII 생산과 관련된 세포의 inulin fructotransferase를 다량 생산하는 균주임을 확인하였다.

효소 생산조건

탄소원의 영향 Inulin을 배분 배지에 각종 탄소원을 1% 첨가하고 *Arthrobacter* sp. A-6를 접종, 37°C에서 48시간 진탕 배양하여 균체 증식과 inulin fructotransferase 생산량을 측정, Table 3과 같은 결과를 얻었다.

Inulin과 특히 glucose와 maltose는 균체 증식에 매우 효과적인 탄소원인 것으로 나타났으나, maltose와 glucose 첨가 경우는 효소 생산이 거의 유도되지 않았다. 반면 inulin은 높은 효소 생산 유도효과를 나타내었으며 2.5% inulin 첨가시에는 1% 첨가시에 비해 약 배에 가까운 효소 생산량을 보였다.

질소원의 영향 질소원을 완전히 빼고 탄소원으로 2.5% inulin을 첨가한 배분 배지에 각종 질소원 0.3%를 첨가하여 질소원 종류에 따른 효과를 조사하

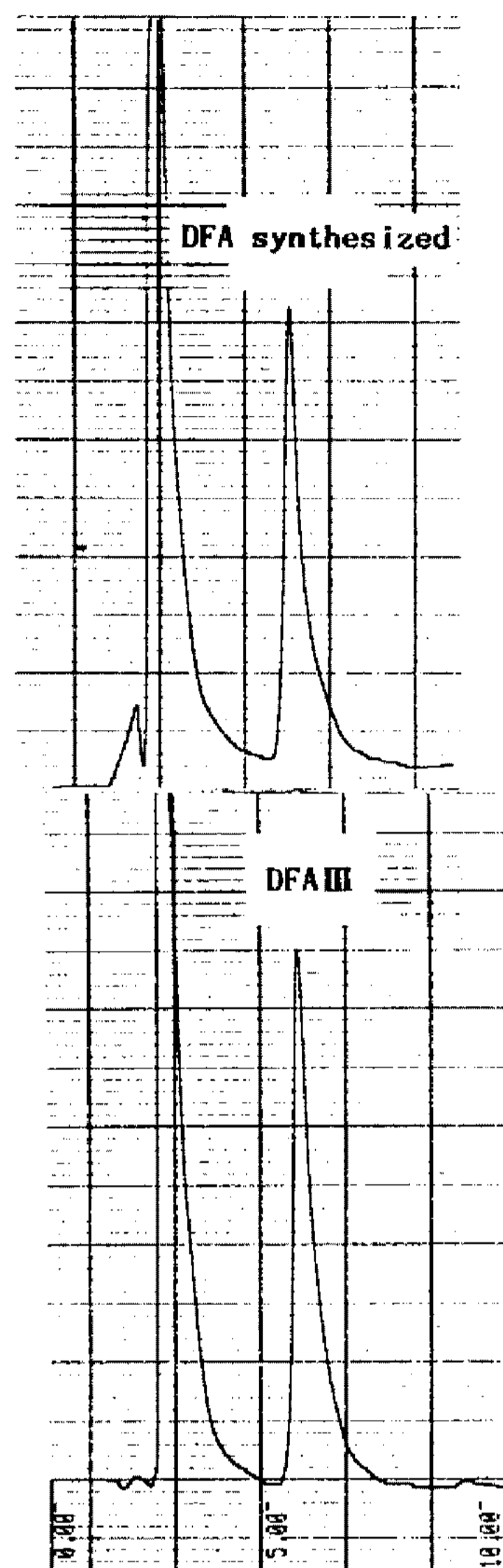


Fig. 4. HPLC chromatograms of the DFAIII standard (lower) and the product of the inulin hydrolysis (upper).

Table 2. ¹³C-NMR chemical shift of the di-D-fructose dianhydride synthesized in this work

Assignment (Carbon atom number)	Chemical shift of ¹³ C-NMR of	
	α-D-fructofuranose	β-D-fructofuranose
2	105.9(106.0)	103.6(103.8)
3	83.6(83.6)	84.3(84.4)
4	77.8(77.9)	74.7(74.8)
5	82.6(82.6)	81.4(81.4)
1	65.8(65.8)	61.3(61.4)
6	63.1(63.2)	63.5(63.5)

Data in parenthesis are from ref. (20)

여 Table 4와 같은 결과를 얻었다. 일반적으로 무기 질소원보다는 유기 질소원이 더 효과적이었으며 유기 질소원 중에서도 0.1% trypton을 첨가했을 때 효소

Table 3. Effect of carbon sources on production of the inulin fructotransferase by *Arthrobacter* sp. A-6

Carbon source (1%, w/v)	Cell Growth (O.D. 590)	Enzyme activity (units/ml)
Inulin	13.74	11.41
Glucose	16.90	0.00
Starch	8.38	0.00
Sucrose	4.58	0.00
Glycerol	3.74	0.00
Lactose	2.63	0.00
α -Cellulose	4.70	0.00
Maltose	16.66	1.17
Fructose	5.17	0.00
None	1.84	0.00

Table 4. Effect of nitrogen sources on production of the inulin fructotransferase

Nitrogen source (0.3%, w/v)	Cell Growth (O.D. 590)	Enzyme activity (units/ml)
Trypton	8.32	20.94
Bacto pepton	6.38	15.23
Yeast extract	9.14	18.66
Corn steep liquor	7.70	10.20
Urea	6.48	8.72
Ammonium sulfate	6.90	7.92
Ammonium phosphate	7.78	16.02
None	0.29	0.00

생산량이 가장 높았다. Yokota 등의 *Arthrobacter* sp. H65-7 균주(4)에 의한 inulin fructotransferase 생산에서는 0.5% yeast extract를 첨가했을 때 다른 질소원의 경우보다 훨씬 높은 효소 생산량을 보였다고 하며 *Enterobacter* sp. S-45(17) 경우는 CSL 첨가시 가장 효과적이었다고 보고하고 있어 본 균주와는 질소원 효과에 있어 차이를 보였다.

금속 이온, 배지 pH 및 배양 온도의 영향 분리용 배지에 포함된 각종 금속 이온이 inulin fructotransferase 생산에 미치는 효과를 조사해 본 결과 Fe, Mg 및 Mn 이온 등은 뚜렷한 균체 증식 효과를 나타내었으나 어느 이온도 효소 생산량의 증대 효과를 나타내지 않았으며 Co와 Zn 이온의 첨가는 오히려 균체 증식과 효소 생산량의 현저한 저하를 가져왔다(별도 자료는 제공하지 않았음).

지금까지의 실험 결과를 종합하여 확립한 효소생산 최적 배지의 수소이온 농도에 따른 효소 생산량을

Table 5. Effect of the initial pH of the culture medium on production of the inulin fructotransferase

Initial pH	Final pH	Cell Growth (O.D. ₅₉₀)	Enzyme activity (units/ml)
4.0	4.3	0.08	0.00
4.5	6.0	17.40	39.28
5.0	6.9	17.48	43.12
5.5	7.5	18.66	51.04
6.0	8.1	18.54	47.20
6.5	8.4	17.44	31.04
7.0	8.7	16.18	27.04

Table 6. Effect of temperatures on production of the inulin fructotransferase

Culture temperature (°C)	Cell Growth (O.D. ₅₉₀)	Enzyme activity (units/ml)
25	20.3	46.19
30	22.0	50.04
35	20.0	43.61
40	18.2	35.77

조사해 본 결과 Table 5와 같이 본 *Arthrobacter* sp. A-6 균주는 약산성 배지에서 가장 높은 효소 생산을 나타내었으나 배양이 진행됨과 더불어 배지 pH는 적은 폭으로 꾸준히 상승, 배양 48시간째에는 pH 7.5가 되었다.

이에 비해 현재까지 보고되고 있는 다른 inulin fructotransferase 생산 균주의 경우는 모두 pH 7.0 부근의 배지에서 최대의 효소 생산량을 나타낸 것으로 보고되고 있다.

또한 효소 생산 최적 배양 온도는 다른 균주들과 마찬가지로 본 균주 역시 30°C 부근의 온도가 가장 적절한 것으로 분석되었다(Table 6 참조).

이상의 결과를 종합하여 *Arthrobacter* sp. A-6에 의한 inulin fructotransferase 생산을 위한 최적 배지는 Table 7과 같은 조성으로 최종 결정하였다.

최적 조건에서의 효소 생산

상기 최적 배지 및 배양 조건에서 *Arthrobacter* sp. A-6를 96시간 진탕 배양하면서 배양 시간대에 따른 균체 증식, 효소 생산 및 DFA 생산 등을 조사하여 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. 균체 증식은 배양 18시간 전후부터 탄소원의 활발한 소비와 더불어 급격히 증가하여 36시간 부근에서 정체기에 돌입하였으며 그

Table 7. Composition of the medium optimal for production of the inulin fructotransferase by *Arthrobacter* sp. A-6

Ingredient	Concentration (/l)
Inulin	25.0 g
Trypton	1.0 g
Tween 80	2.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
CaCl ₂	0.3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.6 mg

Table 8. Effect of pH and temperature on the inulin fructotransferase activity

pH and Temperature (°C)	Enzyme activity (units/ml)	
Effect of pH	4.5	38.70
	5.0	45.45
	5.5	43.29
	6.0	41.85
Effect of Temperature (°C)	50	38.79
	55	44.73
	60	48.51
	65	41.49

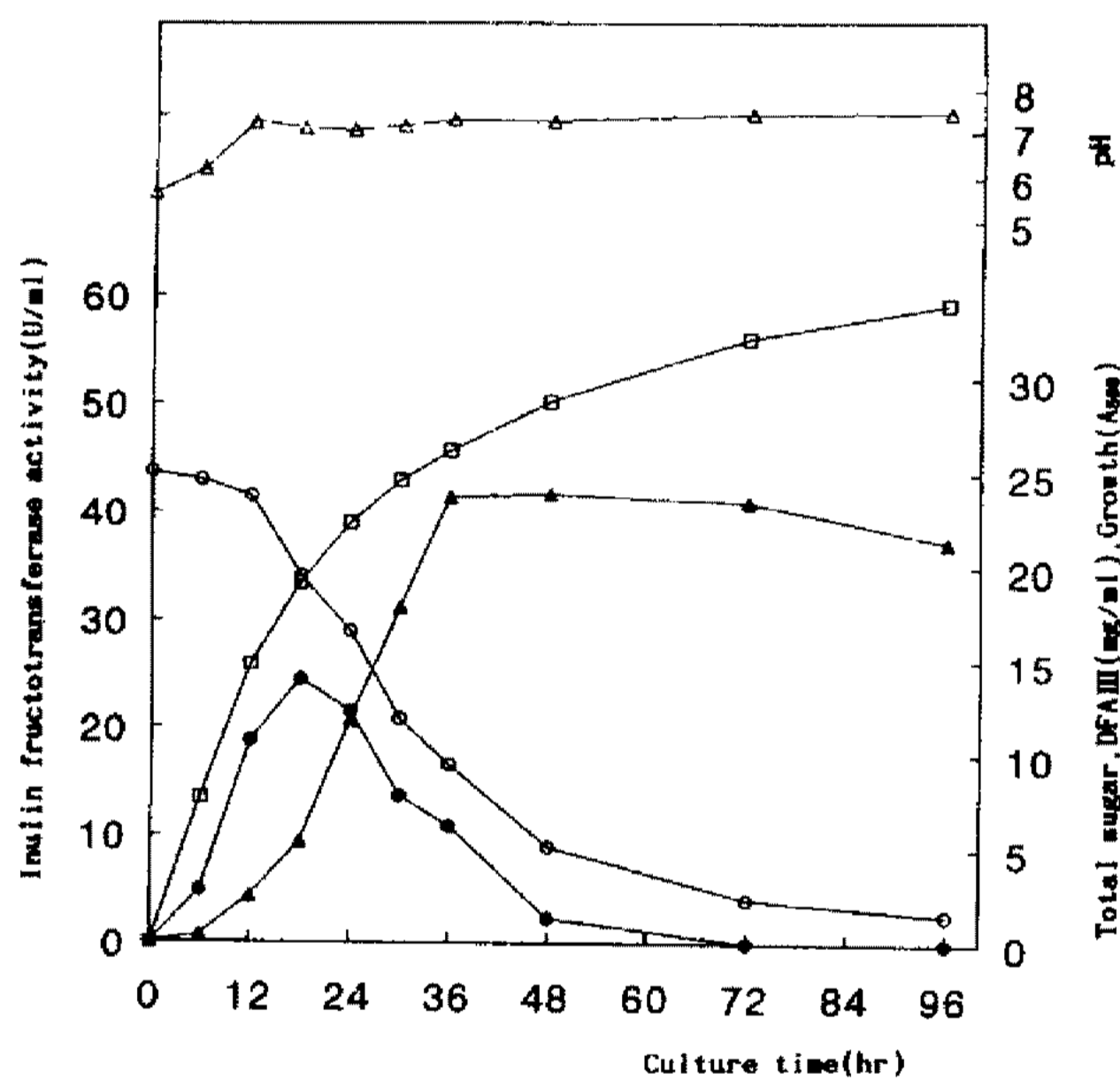


Fig. 5. Time course of inulin fructotransferase production by *Arthrobacter* sp. A-6

-□-; Inulin fructotransferase activity, -○-; Total sugar, -▲-; Growth, -●-; DFAIII, -△-; pH

이후부터는 약간의 증식 저하를 보였다.

반면 inulin fructotransferase 생산은 균체 대수 증식기부터 꾸준한 증대를 보여 배양 96시간까지 증가 경향이 멈추지 않았다. 최고 생산량은 약 60 units/ml로서 Yokota 등의 *Arthrobacter* sp. H65-1 균주의 90 units/ml보다는 약간 떨어지나, 기타 현재까지 보고되고 있는 다른 모든 DFAIII 생산 균주의 5.0 units/ml 이하의 생산량에 비하면 현저히 높은 생산량이라고 하겠다. 또한 배지 중 DFA 농도는 효소 생산에 비례해서 배양 초기에 급격히 증가하다가 배양 24시간째부터는 현저히 감소되는 경향을 보였다. 이것은 아마도 생성된 DFA가 이 시점부터 균체 증식에 필요한 탄소원으로 이용되기 때문인 것으로 추정된다

(16).

한편, 본 균주가 생산하는 inulin fructotransferase 조효소의 효소활성 최적 pH 및 최적 온도는 Table 8에서와 같이 pH 5.0과 60°C를 나타내었다.

요 약

Inulin을 분해하여 DFAIII를 생산하는 inulin fructotransferase(depolymerizing)(EC2.4.1.93)를 세포 외로 다량 생산하는 균주를 토양으로부터 분리하고 분리균(A-6)의 형태적 내지는 생화학적 특성을 조사 분석하여 *Arthrobacter* sp.로 동정하였다.

Arthrobacter sp. A-6 분리균은 초기 pH가 5.2인 2.5% inulin, 0.1% trypton, 0.14% (NH₄)₂SO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.03% CaCl₂, 0.03% MgSO₄·7H₂O, 0.5 mg% FeSO₄·7H₂O, 0.16 mg% MnSO₄·H₂O, 0.2% Tween 80 조성의 배지에서 30°C, 96시간 진탕 배양했을 때 최대의 효소 생산량(약 60 units/ml)을 나타내었다. 또한 분리균이 생산하는 조효소 형태의 inulin fructotransferase의 효소 활성 최적 pH는 5.0, 그리고 최적 온도는 60°C로 측정되었으며 본 효소에 의해 생산되는 DFA는 paper chromatography, HPLC 및 ¹³C-NMR 분석 결과 자료가 DFAIII 표준품과 완전 일치되어 DFAIII인 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구에 도움을 주신 서울대학교 농화학과 김수일 교수님과 KIST 이강봉 박사님께 감사의 말씀을 전합니다.

참고문헌

1. Tanaka, K., T. Uchiyama, and A. Ito. 1972. For-

- mation of di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride from inulin by an extracellular inulinase of *Arthrobacter ureafaciens*. *Biochim. Biophys. Acta.* **284**: 248-256.
2. Haraguchi, K., M. Kishimoto, K. Seki, K. Hayashi, S. Kobayashi, and K. Kainuma. 1988. Purification and properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter globiformis* CII-1. *Agric. Biol. Chem.* **52**(1): 291-292.
 3. Kawamura, M., S. Takahashi, and T. Uchiyama. 1988. Purification and some properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter ilicis*. *Agric. Biol. Chem.* **52**(12): 3209-3210.
 4. A. Yokota, S. Hirayama, K. Enomoto, Y. Miura, S. Takao, and F. Tomita. 1991. Production of inulin fructotransferase (depolymerizing) by *Arthrobacter* sp. H65-7 and preparation of DFAIII from inulin by the enzyme. *Journal of Ferment. Bioeng.* **72**(4): 258-261.
 5. Seki, K., K. Haraguchi, M. Kishimoto, S. Kobayashi, and K. Kainuma. 1989. Purification and properties of a novel inulin fructotransferase (DFAI-producing) from *Arthrobacter globiformis* S14-3. *Agric. Biol. Chem.* **53**(8): 2089-2094.
 6. Matsuyama, T. and K. Tanaka. 1989. On the enzyme of *Aspergillus fumigatus* producing difructose anhydride I from inulobiose. *Agric. Biol. Chem.* **53**(3): 831-832.
 7. Matsuyama, T., K. Tanaka, M. Mashiko, and M. Kamamoto. 1982. Enzymatic formation of di-D-fructose-1,2':2:1'-dianhydride from inulobiose by *Aspergillus fumigatus*. *J. Biochem.* **92**: 1325-1328.
 8. Matsuyama, T., K. Tanaka, and T. Uchiyama. 1991. Isolation and identification of the *Aspergillus fumigatus* difructose dianhydride. *Agric. Biol. Chem.* **55**(5): 1413-1414.
 9. K. Shoichi, S. Koji, H. Kazumoto, K. Mamoru, N. Kazushi, H. Keikichi, K. Keiji, and Mitsuru. 1988. Food ingredients containing difructose dianhydrides. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP 63,269,962 (88,269,962)(CIA23LI/305).
 10. K. Tsutomu, and N. Akio. 1991. Sweetening compositions containing di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride and menthol. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP 03 67,560 (9167,560)(CIA23L1/236).
 11. K. Tosha, and N. Akio. 1993. Lipid-reducing agents containing difructose derivative and breeding animals using them. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP 05,168,419 (93,168,419)(CIA23K1/16)
 12. Krieg, N.R. 1984. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Vol I. Willians and Wilkins Press. Baltimore/London.
 13. Weiner, J. 1978. Determination of total carbohydrate in beer. *J. Inst. Brew.* **84**: 222-223.
 14. M. Ueda, R. Sashida, Y. Morimoto, and H. Ohkishi. 1994. Purification of inulin fructotransferase (DFAI-producing) from *Arthrobacter* sp. MCI 2493 and Production of DFAI from Inulin by the Enzyme. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**(3): 574-575.
 15. S. Kushibe, R. Sashida, and Y. Morimoto. 1994. Production of cyclofructan from inulin by *Bacillus circulans* MCI-2554. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**(6): 1136-1138.
 16. Tanaka, T., Y. Uchiyama, H. Kobori, and T. Tanaka. 1975. Enzymatic hydrolysis of di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride with *Arthrobacter ureafaciens*. *J. Biochem.* **78**(6): 1201-1206.
 17. 강수일, 김수일. 1993. *Enterobacter* sp. S45에 의한 inulin fructotransferase의 생산. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **21**(1): 36-40.
 18. Gerhardt, P., G.E.G. Murray, R.N. Gostilow, F.W. Nester, A.W. Wood, N.R. Krig, and G.B. Philips. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington.
 19. J.L. Bryson, and T.J. Mitchell. 1951 Improved spraying reagents for the detection of sugars on paper chromatograms. *Nature.* **167**: 864.
 20. Uchiyama, T. 1982 Anomeric configurations of di-D-fructose anhydride, produced by fructotransferase. *Carbohydrate Res.* **101**: 138-140.

(Received 25 October 1994)