

## Bacillus sp. snu-7에 의한 Inulin Fructotransferase의 생산

김우표 · 강수일 · 김수일\*

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과\* 및 농업생물신소재연구센터

**요약** : Inulin을 가수분해하여 di-D-fructofuranose dianhydride(DFA)를 생성하는 inulin fructotransferase를 분리하는 균주를 토양으로부터 분리하였으며, *Bacillus* sp.로 동정되었다. 본 효소에 의하여 생성되는 DFA는 TLC와 HPLC로 분석한 결과, fructose 두 분자가  $\beta$  1,2' :  $\alpha$  2,3' 결합을 한 DFA III로 동정되었다. 본 균주는 탄소원으로 1.5% 돼지감자즙, 유기 질소원으로 1.0% peptone, 무기 질소원으로 0.27%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 를 사용했을 때 효소 생산이 2.709 units/ml로 최대였으며, inulin을 탄소원으로 사용할 경우는 1.0% yeast extract, 0.2%  $\text{NaNO}_3$ 를 첨가했을 때 효소 생산이 2.245 units/ml로 최대를 나타내었다. 본 균주를 최적 액체 배지에서 72시간 배양한 결과 배양 45시간에 2.61 units/ml의 최대 활성을 보였다.(1997년 3월 15일 접수, 1997년 4월 4일 수리)

### 서 론

Inulin은 fructose가  $\beta$ -2,1 결합으로 연결되어있는 비환원성 말단에 glucose와 fructose의 결합인 sucrose형태로  $\alpha$ -1,2 결합을 한 fructan으로 돼지감자, 치커리, 다알리아 등의 식물체의 저장 탄수화물로 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>1-4)</sup> Inulin 분해에 관련된 효소 중 inulin fructotransferase는 분자내 과당 전이반응에 의해 inulin으로부터 두 분자의 fructose가 두 곳에서 탈수결합을 한 di-D-fructose dianhydride (DFA)를 생성하는 효소로 di-D-fructose 1,2' : 2,1' dianhydride (DFA I)를 생성하는 효소(E.C. 2.4.1.200)와 di-D-fructose 1,2' : 2,3' dianhydride (DFA III)를 생성하는 효소(E.C. 2.4.1.93)가 보고되었다. DFA III를 생성하는 inulin fructotransferase는 Tanaka 등<sup>5)</sup>에 의해 *Arthrobacter ureafaciens*에서 처음 보고된 이래 *Arthrobacter globiformis*,<sup>6)</sup> *Arthrobacter ilicis*,<sup>7)</sup> *Arthrobacter* sp. H65-7,<sup>8)</sup> *Enterobacter* sp. S45,<sup>9)</sup> *Arthrobacter* sp. A-6<sup>11)</sup> 등 여러 가지 균주에서도 생산되는 것으로 보고되었다.

DFA III는 dioxane ring을 함유하고 있어 fructose나 다른 oligosaccharide에 비해 안정하며, 치아 부식 방지, 장내 *Bifidus*균의 증식 촉진, 혈중 cholesterol 농도의 감소 촉진 등의 여러 가지 생리 효과를 갖는 것으로 보고되었으며,<sup>12,13)</sup> 유용한 감미료로서의 사용이 기대되고 있다.

본 연구실에서는 이미 *Enterobacter* sp.로부터 inulin fructotransferase를 생산하기 위한 최적 배지 조성을 조사하여 보고하였으며,<sup>9)</sup> 이 효소를 정제하여 특성을 밝혔으나<sup>10)</sup> 이 경우에는 효소 활성이 0.22 unit/ml로 매우 낮아 효과적인 DFA III의 생산을 위해 효소 활성이 높은 균주를 선발하고자 하였으며 이에 본 논문에서는 이를 보고하였다.

### 재료 및 방법

#### Inulin fructotransferase 생산 균주의 분리 및 동정

멸균수에 희석한 토양 시료를 탄소원으로 inulin을 넣은 고체 배지<sup>14)</sup>에 도말한 후, 30°C에서 3일 동안 배양하여 자라는 균주들을 inulin 이용균주로 1차 선별하였다. 이들을 다시 inulin 액체 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 배양액을 원심분리하였으며, 배양상등액을 TLC로 분석하여 DFA 생성 여부를 조사하였다. 배양상등액 중에서 DFA가 검출되는 균주를 inulin fructotransferase 생산 균주로 최종 선별하였다. 분리된 균주는 *Bergey's manual of systematic bacteriology*<sup>15)</sup>에 따라 동정하였다.

#### DFA의 분리 및 동정

선발된 균주의 96시간 배양액을 원심분리하여 얻은 배양상등액을 효소액으로하여 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.5)에 녹인 2% inulin과 40°C에서 24시간 반응시킨 후 반응액을 감압 농축하였다. 농축된 시료를 Bio-gel P2 column chromatography로 분리한 후 anthrone법<sup>16)</sup>으로 총당을 정량하여 분리된 분획들을 검출하였으며, 이 분획들을 TLC 및 HPLC로 분석하여 본 연구실에서 이미 분리 동정한 표준 DFA III<sup>9)</sup>와 같은 이동도 및 용출시간을 보이는 분획을 수집하였다.

#### 영양원에 따른 효소 생산

Inulin 액체 배지를 기본 배지로하여, 탄소원의 영향은 inulin 대신에 soluble starch, sucrose, glucose, 돼지감자즙을 첨가한 각각의 배지에 균을 접종하여 30°C에서 72시간 진탕 배양한 후 배양상등액의 inulin fructotransferase 활성을 측정하여 조사하였으며, 유기 질소원의 영향은 yeast extract 대신에 peptone, corn steep liquor, beef extract를, 무기 질소원의 영향은  $\text{NaNO}_3$  대신에  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 첨가하여 탄소원의 영향과 같은 방법으

찾는말 : inulin fructotransferase, di-D-fructofuranose 1,2' : 2,3' dianhydride(DFA III), *Bacillus* sp. snu-7

\*연락처

로 조사하였다. 이때 사용한 돼지감자즙은 돼지 감자 분말을 증류수와 1:5로 섞어 85°C에서 30분간 열추출하고 gauze로 거른 후 12,000 r.p.m.에서 30분간 원심 분리하여 제조하였다.

**배양 시간에 따른 효소 생산**

Inulin 액체 배지에서 48시간 배양한 균주를 inulin fructotransferase 생산 최적 배지(1.5% 돼지감자즙, 1% peptone, 0.27% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% KCl, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 7.0) 2.5 l가 든 5l발효조에 접종하여 70시간 배양하면서 일정 시간 간격으로 배양액을 채취하여 균 성장, 총당, DFA III 함량, 효소 활성을 조사하였다. 이때 교반은 400 r.p.m.으로, 통기 조건은 1.7 v.v.m. (volume of air per volume of liquid medium)으로 하였으며, 소포제로는 AZ 20R 0.01%를 사용하였다.

**효소 활성 측정**

효소 활성은 효소에 의해 inulin이 분해되어 생성되는 DFA III의 양을 HPLC 방법으로 정량하였다. 효소 반응은 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.5)에 녹인 2% inulin 0.5 ml에 배양액을 효소액으로 하여 0.5 ml를 첨가한 후 40°C에서 1시간 반응시켰다. DFA III 표준 정량 곡선은 0.1~2 mg/ml의 농도에 대한 면적으로 작성하였으며, 효소 단위 1 unit는 동일 조건에서 1분동안 1 μmole의 DFA III를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

**분석 방법**

TLC는 하 등<sup>17)</sup>의 방법으로 n-propanol : ethyl acetate : water(2 : 2 : 1) 전개 용매에서 2중 전개하고 urea-metaphosphoric acid<sup>18)</sup>로 발색하였고, 총당은 fructose를 표준당으로 하여 anthrone법으로 정량하였다. Bio-gel P2 column chromatography는 강 등<sup>9)</sup>의 방법에 따라 하였다. 즉, 65°C로 유지한 Bio-gel P2(Bio-Rad, 200~400 mesh) column (210×1.2 cm)에 당용액 1 ml(200 mg/ml)를 주입한 후, 1 ml/min로 용출, 1 ml/tube로 분획하였으며, 각 분획은 총당을 정량한 후 TLC로 분석하였다. HPLC에 의한 DFA III의 확인 및 정량은 TOSOH SC 8010 HPLC로 하였으며, 이때 column은 Amide 80-TM(4.6×250 mm)를, 용매는 acetonitrile : water(65 : 35, v/v)를 사용하였고, 유속은 1.0 ml/min로 하였다. 당의 검출은 RI detector(RI 8010)를 사용하였으며, column의 온도는 70°C를 유지하였다. 균 성장은 590 nm에서의 배양액의 흡광도를 측정하여 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**Inulin fructotransferase 생산 균주의 분리 및 동정**

토양으로부터 1, 2차 선발과정을 통해 최종적으로 7번 균주를 선발하였으며(Fig. 1), 이 균주의 60시간 배양상등액을 효소액으로하여 inulin과 반응시킨 반응물을 TLC로 검

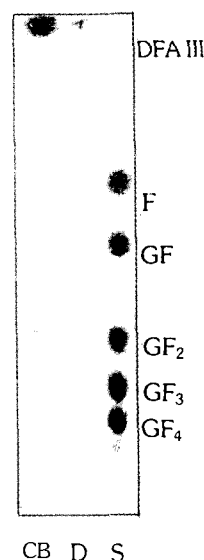


Fig. 1. TLC chromatogram of culture broth of strain No. 7. Cultivation was carried out at 30°C for 24 hrs. CB, Culture broth; D, DFAIII; S, Standard sugar.

정한 결과 inulin은 DFA와 소량의 올리고당으로 변환되어 본 균주는 inulin fructotransferase를 분비함을 알 수 있었다(Fig. 2). 본 균주의 특성을 조사한 결과, Gram 양성으로 간상형이었으며, facultative anaerobe로 포자를 형성하였고, 포도당을 발효하는 것으로 밝혀져 잠정적으로 *Bacillus* sp.로 추정하였다.

**DFA의 분리 및 동정**

본 균주의 96시간 배양액과 inulin을 반응시킨 반응물을 Bio-gel P2 column chromatography로 정제한 후 TLC로 확인한 결과 표준 DFA III와 동일한 이동도를 나타내는 분획은 단일 물질로 확인되었으며, HPLC 분석 결과에서도 표준 DFA III와 동일한 용출시간을 나타내 본 효소에 의해 생산되는 DFA는 DFA III로 확인되었다(결과 미제시).

**효소 생산 조건**

**(1) 탄소원의 영향**

액체 기본 배지에 각종 탄소원을 1.5%로 첨가하여 30°C에서 72시간 진탕배양하고 효소 활성을 측정된 결과, 1.5% 돼지감자즙을 사용하였을 때 효소 활성이 2.429 units/ml로 가장 높았으며 inulin을 사용하였을 경우에는 2.245 units/ml로 돼지감자즙보다는 약간 낮은 결과를 나타내었다(Table 1). Soluble starch와 sucrose를 사용하였을 경우에는 돼지감자즙에 비해 각각 26%, 6%의 활성만을 보였으며, glucose를 사용할 경우에는 거의 활성이 존재하지 않았다(Table 1). 이 결과로 볼 때 본 효소는 *Arthrobacter* sp. H 65-7(8)과 *Enterobacter* sp. S45<sup>9)</sup>가 분비하는 효소처럼 inulin에 의해 유도발현되는 것으로 추정되었다.

**(2) 유기질소원의 영향**

Inulin이나 돼지감자즙을 탄소원으로 사용한 액체 기본 배지에 각종 유기질소원을 1.0% 농도로 첨가하여 탄소원의

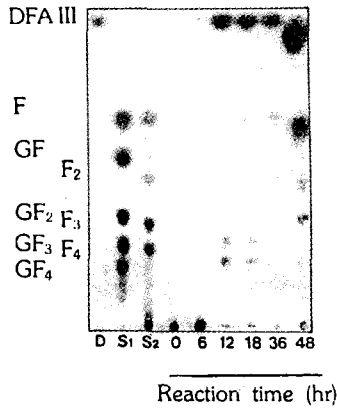


Fig. 2. TLC chromatogram of inulin hydrolysate reacted with culture broth from strain No. 7. The reaction was carried out at 40°C for the indicated period in a mixture containing 0.5 ml of 2% inulin dissolved in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) and 0.5 ml of the culture broth of 60 hrs cultivation. D, DFA III; S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub>, Standard sugar.

영향 실험과 동일한 방법으로 배양한 후 효소활성을 조사한 결과, 돼지감자즙을 탄소원으로 사용한 액체 배지에서는 peptone을 첨가했을 때 2.709 units/ml로 효소생산이 가장 높았고, beef extract와 yeast extract를 사용했을 경우에는 각각 2.541 units/ml, 2.429 units/ml로 비슷한 결과를 나타내었으나, corn steep liquor를 사용할 경우에는 0.945 unit/ml로 매우 낮은 효소 활성을 보였다(Table 1).

Inulin을 탄소원으로 사용한 액체 배지에서는 yeast extract를 사용한 경우 2.245 units/ml로 가장 높은 활성을 보였으며, beef extract를 사용했을 경우에는 2.098 units/ml로 비슷한 값을 나타내었으나, corn steep liquor와 peptone을 사용할 경우에는 각각 1.66 units/ml와 1.194 units/ml로 낮게 나타났다(Table 1). Inulin을 탄소원으로 사용한 *Arthrobacter* sp. H65-7<sup>8)</sup>와 *Enterobacter* sp. S45<sup>9)</sup>의 경우는 각각 yeast extract, corn steep liquor를 첨가하였을 때 효소생산이 가장 높은 것으로 보고되었다.

(3) 무기질소원의 영향

돼지감자즙과 peptone을 함유한 첨가한 배지에 각종 무기질소원을 0.2% NaNO<sub>3</sub>의 질소함량과 동일한 수준으로 첨가하여 본 균주를 배양후 배양액의 효소 활성을 조사한 결과, 무기질소원으로는 0.27% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 사용하였을 때 3.078 units/ml로 가장 높았으며, 0.16% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.09% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.2% NaNO<sub>3</sub> 사용할 때에는 각각 2.150 units/ml, 2.349 units/ml, 2.709 units/ml의 효소 활성을 보였다(Table 1). Inulin과 yeast extract를 함유한 배지에 각종 무기질소원을 첨가한 경우에는, NaNO<sub>3</sub>에서 2.245 units/ml로 가장 높은 활성을 보였으며, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>에서는 훨씬 낮은 효소 활성을 보였다(Table 1).

이상의 결과로부터 본 실험 조건하에서 inulin fructotransferase의 최적 배지 조성은 탄소원으로는 1.5% 돼지감자즙, 유기질소원으로는 1.0% peptone, 무기질소원으로는 0.27% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 사용하는 것이 적합한 것으로 판명

Table 1. Effects of nutrient sources on the production of inulin fructotransferase from *Bacillus* sp. snu-7.

Source	Component	Enzyme activity (Unit/ml)	
Carbon (1.5%)	Inulin	2.245	
	<i>Jerusalem artichoke</i> extract	2.429	
	Soluble starch	0.626	
	Sucrose	0.147	
	Glucose	0.048	
Organic nitrogen	Yeast extract	2.245 <sup>a</sup>	2.429 <sup>b</sup>
	Corn steep liquor	1.660	0.945
	Peptone	1.194	2.709
	Beef extract	2.098	2.541
	Inorganic nitrogen	NaNO <sub>3</sub>	2.245 <sup>a,c</sup>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.828	2.150
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.736	3.078
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.051	2.347

<sup>a</sup>carbon source, inulin; <sup>b</sup>carbon source, *Jerusalem artichoke* extract; <sup>c</sup>organic nitrogen source, yeast extract; <sup>d</sup>organic nitrogen source, peptone.

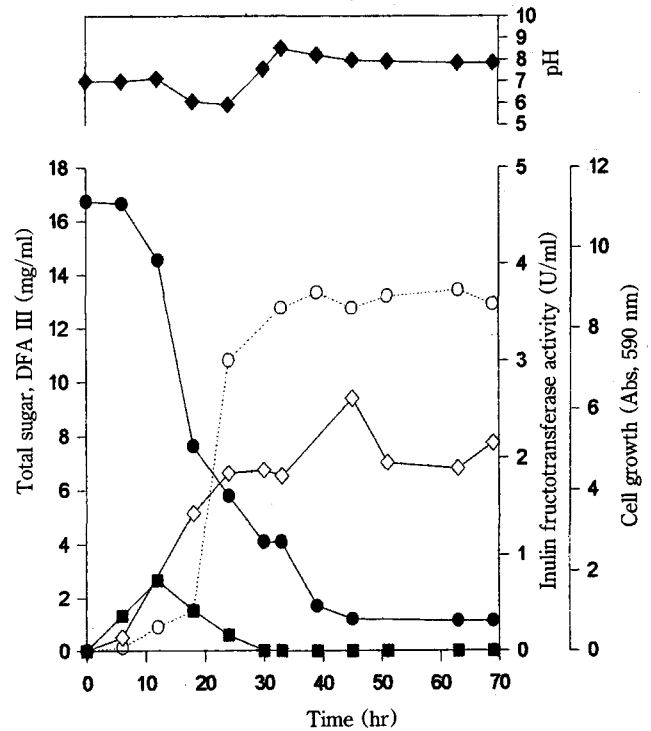


Fig. 3. Time course of inulin fructotransferase production by *Bacillus* sp. snu-7. Cultivation was carried out for 70 hrs. The medium contained 1.5% *Jerusalem artichoke* extract, 1% peptone, 0.27% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% KCl, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. The pH was 7.0. ●—●, Total sugar; ◆—◆, pH; ■—■, DFA III; ○—○, Cell growth; ◇—◇, Inulin fructotransferase activity.

되었으며, 이 배지 조성을 추후 실험에 사용하였다.

배양 시간에 따른 효소의 생산

돼지감자즙을 탄소원으로 한 최적 액체 배지에서 균주를 배양하면서 일정 시간별로 균 배양액을 채취하여 효소 활성, 총당, DFA III 생성량, 균 성장 및 pH 변화를 조사하였

으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. 균 성장은 배양 후 24시간 부터 급격히 증가하다가, 배양 후 33시간 이후에는 steady state에 도달하였으며, 효소 활성은 균 성장이 증가하면서 같이 증가하다가 배양 45시간에는 2.61 units/ml로 최고치를 나타낸 후 감소하여 일정한 값을 유지하였다. 이러한 효소 생산량은 지금까지 보고된 효소와 비교하여 볼 때 *Arthrobacter ureafaciens*<sup>5)</sup>의 0.05 unit/ml, *Enterobacter* sp. S45<sup>9)</sup>의 0.22 unit/ml, *Arthrobacter globiformis* C11-1<sup>6)</sup>의 0.98 unit/ml에 비해서는 높으나, *Arthrobacter* sp. A-6<sup>10)</sup>의 60 units/ml, *Arthrobacter* sp. H65-7<sup>8)</sup>의 90 units/ml 등에서 보고된 값에 비해서는 아주 낮은 것이다. 총당은 꾸준히 감소하여 배양 후 39시간이 지난 후 거의 소비되었다. 배양액 중의 DFA III는 배양 초기에 생성되어 배양 12시간에는 2.66 mg/ml로 최고치를 보였으나, 계속 감소하여 배양 24시간이후에는 거의 소멸되었다. 이러한 DFA III의 생성과 소멸은 *Arthrobacter* sp. H65-7,<sup>8)</sup> *Enterobacter* sp. S45,<sup>9)</sup> *Arthrobacter* sp. A-6<sup>10)</sup> 등에서도 보고된 바 있으며, Toru 등<sup>19)</sup>이 *Arthrobacter ureafaciens*의 균체 파쇄물에서 DFA III를 F<sub>2</sub>를 거쳐 fructose로 분해하는 효소 활성을 확인한 점으로 미루어 균체 밖에서 생성된 DFA III가 균체 내부로 흡수되어 fructose로 분해되어 소비되는 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 농업생물신소재연구센터 1991년도 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

1. Pollock C. J. and N. J. Chatterton (1988) Fructans in the Biochemistry of plants. Academic Press, New York., **14**, 109.
2. Rutherford P. P. and E. W. Weston (1968) Carbohydrate change during cold storage of some inulin containing roots and tubers. *Phytochem.*, **7**, 175-180.
3. Soja G., G. Dersch and W. Praznix (1990) Harvest Dates, Fertilizer and Varietal Effects on Yield, Concentration and Molecular distribution of fructan in Jerusalem Artichoke. *J. Agronomy and Crop Science.*, **165**, 181-189.
4. Whistler R. L. and C. L. Smart (1973) Fructans in higher plants, in polysaccharide chemistry. Academic Press, New York, 276-310.
5. Tanaka K., T. Uchiyama, and A. Ito (1972) Formation of di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride from inulin by an extracellular Inulase of *Arthrobacter ureafaciens*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **284**, 248-256.

6. Kazumoto H., M. Kishimoto, K. Seki, K. Hayashi, S. Kobayashi and K. Kainuma(1988) : Purification and Properties of Inulin Fructotransferase(Depolymerizing) from *Arthrobacter globiformis* C11-1. *Agric. Biol. Chem.*, **52**(1), 291-292.
7. 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.
8. Yokota A., 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 DFA III from Inulin by the Enzyme. *J. Ferment. and Bioeng.* **72**(4), 258-261.
9. 강수일, 김수일 (1993) *Enterobacter* sp. S45 에 의한 inulin fructotransferase의 생산. *한국산업미생물학회지*, **21**(1), 36-40.
10. 강수일, 김수일 (1993) *Enterobacter* sp. S45 생산 inulin fructotransferase의 정제 및 특성, *한국농화학회지*, **36**(2), 105-110.
11. 박정복, 권영만, 최용진 (1995) *Arthrobacter* sp. A-6에 의한 Inulin Fructotransferase (Depolymerizing)의 생산, *한국산업미생물학회지*, **23**(1), 68-74.
12. 박정복, 김소자, 최용진 (1996), 감미료 소재로서 Di-D-Fructofuranose Dianhydride III의 물리 및 생리적 특성, *한국산업미생물학회지*, **24**(5), 619-623.
13. Shoichi K., S. Koi, H. Kazumoto, K. Mamoru, N. Kazushi, H. Keikichi, K. Keji and K. Mitsuru (1988) Food ingredients containing difructose dianhydrides. Japan. Kokai Tokyo Koho P 63,269,962 (88,269,962) (CIA23LI/305).
14. Kawamura M., T. Uchiyama, T. Kuramoto, Y. Tamura and K. Mizutani(1989) Formation of a Cycloinulooligosaccharide from Inulin by an Extracellular Enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ 31B. *Carbohydrate Res.* **192**, 83-90.
15. Krieg, N. R. (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams and Wilkins Press. Baltimore/London.
16. Weiner, J. (1978) Determination of Total Carbohydrate in Beer. *J. Inst. Brew.*, **84**, 222.
17. 하영주, 최연호, 김수일. (1989) *Streptomyces* sp. S56으로부터 endo형 inulase의 생산. *산업미생물학회지*, **17**, 593-599.
18. Dawson, R. M. C., D. C. Elliot, W. H. Elliot and K. M. (1986) Databook for Biochemical Research 3rd Ed., 475, Oxford Univ. Press, New York
19. Toru T., T. Uchiyama, H. Kobori and K. Tanaka (1975) Enzymic Hydrolysis of Di-D-Fructofuranose 1,2':2,3' Dianhydride with *Arthrobacter ureafaciens*. *J. Biochem.*, **78**, 1201-1206.

---

Production of Inulin Fructotransferase(Depolymerizing) from *Bacillus* sp. snu-7

Kim, Woo-Pyo, Su-II Kang and Su-II Kim\* (*Department of Agricultural Chemistry and Research Center for New Bio-materials in Agriculture and Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University. Suwon 441-744. Korea\**)

**Abstract :** A bacterial strain, producing extracellular inulin fructotransferase which converts inulin into di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride(DFA III), was isolated from soil and presumed as *Bacillus* sp.. The highest production of the enzyme was obtained by using medium containing *Jerusalem artichoke* extract as carbon source, peptone as organic nitrogen source, and  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  as inorganic source. Under optimum condition, the enzyme activity of the culture broth supernatant reached maximal 2.61 units/ml after cultivation for 45 hrs.

---

**Key words :** Inulin fructotransferase, di-D-fructofuranose 1,2' : 2,3' dianhydride(DFA III), *Bacillus* sp.

\*Corresponding author