

Arthrobacter ureafaciens KCTC 33870이 생산하는 InulaseII의 정제 및 특성

이재찬 · 이기영^{1,3*} · 송기방⁴ · 이용복²

전남대학교 공업화학과, ¹생물화학공학과, ²약학부, ³고분자기술연구소,
⁴생명공학연구소 응용미생물연구부

Purification and Properties of InulaseII from *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387. Lee, Jae-Chan, Ki-Young Lee^{1,3*}, Ki-Bang Song⁴, and Yong-Bok Lee². Department of Chemical Technology, ¹Department of Biochemical Engineering, ²Faculty of Pharmacy, ³Polymer Science and Technology Center, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea, ⁴Applied Microbiology Research Division, KRIBB, KIST, P.O. Box 115, Yusong-gu, Taejeon 305-600, Korea – Inulin fructotransferase(depolymerizing)(EC 2.4.1.93)(inulaseII) which converts inulin into di-D-fructofuranose-1,2':2,3'-dianhydride (DFAIII) was purified from *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387 using column chromatography on DEAE-Toyopearl 650 M and gel filtration on Sephadex G-200. The enzyme was purified 7-fold with a yield of 11% from a culture supernatant. The purified enzyme gave a single band on polyacrylamide gel electrophoresis, and the molecular weight of the enzyme was estimated to be 45,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature for the enzyme reaction were pH 6.5~7.0 and 55°C, respectively. The enzyme was stable within a pH range of 5.0 to 10.6 and up to 60°C. The K_m of this enzyme for DFAIII production was 11.9 mM. The enzyme was inactivated by Hg^{2+} and after exhaustive digestion of inulin by this enzyme, 1-kestose and nystose were produced in addition to DFAIII.

Key words : inulin, DFAIII, inulaseII, *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387

Inulin은 30-35 단위의 D-fructose가 β -2,1 결합에 의해 직쇄상으로 중합되어 있는 다당류로 inulin fructotransferase(depolymerizing)(E.C. 2.4.1.93)에 의한 DFA 생산의 기질이 된다. DFA(difructose anhydride)는 2개의 fructose가 결합된 환상2당으로 과당과 비슷한 맛을 가지고 있으며, 감미도는 50% 정도이고, 비소화성이며, 충치발생저해, 감미료, 비피더스균 증식인자, mineral 흡수 촉진인자 등으로 알려져 있고, 철과의 복합체를 형성하여 인체내에서의 철의 흡수를 촉진하는 철결핍성 빈혈치료제로 사용될 수 있는 것으로 보고되었다[1].

또한 비환원형 말단을 갖지 않기 때문에 anomer가 존재하지 않으며 고농도로 존재하면 결정성이 우수하고 산이나 알칼리에도 비교적 안정한 것으로 알려져 있으며 현재 DFA I-V까지 5종이 밝혀져 있다[7]. 한편 DFAIII를 합성하는 inulaseII 효소는 *Arthrobacter ureafaciens*[11-14], *Arthrobacter globiformis* C11-1[4], *Arthrobacter ilicis* OKU17B[6], *Arthrobacter* sp. H65-7[15,16] 등의 미생물에 의해 생산된다. 본 실험에서는 철의 흡수를 촉진시켜 주는 DFAIII의 대량생산과 분리·정제 기술의 개발을 위해

Arthrobacter ureafaciens KCTC 3387 균주에서 DFAIII 생산효소의 분리정제 및 효소의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용시약

Inulin(from dahalia tuber)과 Coomassie Brilliant Blue R-250은 Sigma사에서 구입하였고, 1-kestose(GF₂), nystose(GF₃), 1-F-fructofuranosyl-nystose(GF₄)는 일본 명치제약주식회사 제품을 사용하였으며, 분자량 측정을 위한 marker protein 및 단백질정량을 위한 Bradford protein assay 시약은 Bio-Rad사 제품을 사용하였고, 기타 일반시약은 시판 1급의 분석용 시약을 사용하였다.

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387은 KCTC로부터 분양 받아 사용하였으며, 배양에 사용한 배지는 Yokota[16] 등이 사용한 배지에서 inulin의 양을 달리하여 사용하였고 그 조성은 다음과 같다. 배지 1 liter 중에는 25 g inulin, 2 g NaNO₃, 0.5g MgSO₄·7H₂O, 0.5 g KCl, 0.5 g KH₂PO₄, 0.01 g FeSO₄·7H₂O, 0.2 g yeast extract 및 15 g의 agar를 포함하며, 2M NaOH로

*Corresponding author

Tel. 82-62-530-1843, Fax. 82-62-530-1849
E-mail: kilee@chonnam.chonnam.ac.kr

pH를 7.0으로 조절하여 사용하였다. 배양과정 중의 균체중식은 660 nm에서의 OD로 측정하였으며 건조세포중량으로 표시하였다.

미생물 발효배양 및 효소정제

발효조는 7L 발효조(한국발효기, KF-7L)에 본배양액 2%(80 mL)를 접종하였고, 조업용량은 4 L, 공기는 1vvm을 공급하였으며, 교반속도는 600 rpm, 온도는 26°C로 유지시켰고, pH는 연동펌프를 통해 NaOH를 자동 주입하여 7.0으로 유지시켜 배양하였다. 균체를 제거한 후 한외여과장치(M.W. cut off 10,000)를 통하여 농축한 배양상등액의 (NH₄)₂SO₄ 60% 포화침전물을 원심분리하여 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 것을 조효소로 사용하였다. 조효소의 1차정제는 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형 시킨 DEAE-Toyopearl 650M column (2.5 × 75 cm)(Tosoh Co., Ltd., Tokyo)에 조효소 17 mL을 주입하고 21 mL/h의 유속으로 흘러보내면서 bed volume의 5배의 동일 buffer로 washing 하였다. 활성분획을 모아 amicon concentrator에서 여과(M.W. cut off 10,000)시켜 농축한 후 다음 정제에 사용하였다. 2차 정제는 농축액을 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 Sephadex G-200 column(2.5 × 75 cm)에 흡착시키고 42 mL/h 유속의 동일 buffer로 용출시킨 다음 활성분획을 모아 amicon concentrator에서 한외여과(M.W. cut off 10,000) 한 후 다음 실험에 사용하였다.

효소활성 측정 및 단백질량 측정

효소의 활성은 효소에 의해 inulin이 분해되어 생성되는 DFAIII의 양을 HPLC로 정량하여 측정하였다. 효소반응은 10%(w/v) inulin 0.5 mL, 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.25 mL 및 조효소액 0.25 mL의 총 1.0 mL의 반응액을 37°C에서 20분간 반응시켰으며 반응 후 끓는 물에 5분간 가열하여 반응을 정지시켰다. 효소활성단위는 상기조건 하에서 효소액 1 mL이 1분 동안에 1 μmole의 DFAIII를 생성하는 것을 1 unit으로 정의하였다. 단백질량은 bovine serum albumin을 표준물로 하여 Bradford 방법[2]을 사용하여 정량하였으며 column chromatography에서 단백질량을 280 nm로 측정하였다.

HPLC

생산된 DFAIII의 정량적인 분석을 위해서 사용하였다. 분리관은 Sugar-Pak column, 검출기는 RI detector, 용리액으로는 0.5 mL/min의 물을 사용하였다.

전기영동

효소의 정제과정의 확인 및 분자량 측정은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하

여 Laemmli method[8]에 의하여 행하였다. Acrylamide의 농도는 10%로 하였고, native gel은 8%로 하였다. SDS-PAGE에 의한 inulaseII의 분자량은 표준단백질(Bio-Rad)과 비교하여 결정하였다.

TLC 분석

분해산물의 분석은 silica gel plate(Silica gel 60, Merck)를 사용하여 1-butanol : 2-propanol : water : acetic acid (7 : 5 : 4 : 2, v/v)의 혼합용매로 전개하였으며, 분리된 당 spot은 발색시약 [p-anisaldehyde : H₂SO₄ : ethanol(1 : 1 : 18, v/v)]을 분무하여 oven에서 가열하여 검출하였다.

결과 및 고찰

미생물 발효

Inulin의 농도를 25 g/L로 하여 배양하였다. 발효 7시간 이후 세포성장기 급격히 증가하면서 DFAIII가 급속히 생산되었으며 inulin의 급격한 소비가 일어났다. 발효는 DFAIII 양이 최고정점에 달한 후 감소하기 시작하는 시점(15시간)에서 정지시켰으며 그 때의 세포는 지수성장기의 말기상태였고 기질은 약 15 g/L가 소비되었다. Yokota 등[16]의 *Arthrobacter* sp. H65-7, Park 등[9]의 *Arthrobacter* sp. A-6 및 Kang 등[5]의 *Enterobacter* sp. S45에서 inulaseII의 활성은 계속 증가하는 반면에 DFAIII는 배양도중 생성되었다가 감소하는 경향을 나타내고 있음을 보고하였다. Tanaka 등[12]과 Sakurai 등[10]은 DFAIII를 inulobiose를 거쳐 fructose로 분해하는 효소가 존재함을 보고하고 있어, DFAIII 양이 감소하기 시작하는 시점에서 발효를 정지시켰다.

효소의 정제

Arthrobacter ureafaciens KCTC 3387 배양액으로부터 ultrafiltration 및 (NH₄)₂SO₄로 침전시켜 제조한 조효소액을 DEAE-Toyopearl 650M에서 ion exchange chromatography를 한 다음 inulaseII의 활성을 나타내는 분획들을 모아 amicon concentrator로 농축하여 Sephadex G-200에서 gel filtration을 행하였다. 반복실험 결과 DEAE-Toyopearl 650M에서 inulaseII 활성을 가진 분획은 buffer로 washing 한 부분에서 나타났는데 Yokota 등[15]은 gel filtration을 한 다음 DEAE-Toyopearl 650M을 사용하여 NaCl gradient를 통해 효소를 용출시켜 분리하였으나 본 실험에서는 같은 방법으로 사용하였음에도 결과가 다르게 나타났다. 이 분획들을 각각 농축하여 10% polyacrylamide gel 전기영동한 결과(Fig. 1) 재정제한 inulase는 전기영동상에서 단일 band로 나타났으며 native gel electrophoresis를 하여 활성 염색한 결과(Fig. 2) inulaseII의 활성을 확인할 수 있었다. 정제과정 중의 본 효소의 비활성은 mg 당 각각 1.51,

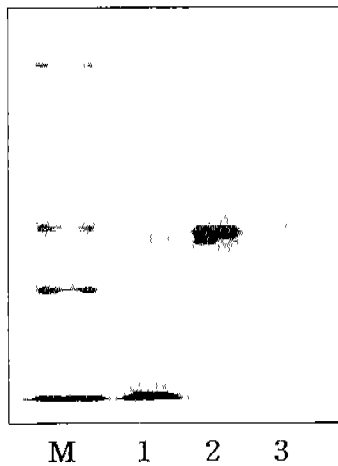


Fig. 1. SDS-PAGE(10%) analysis of inulase II purification process. Lane M: Molecular weight standard, 1: (NH₄)₂SO₄ precipitation (60%), 2: DEAE-Toyopearl 650M, 3: Sephadex G-200

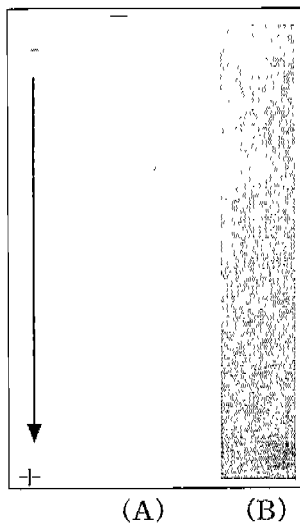


Fig. 2. Native polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme on Sephadex G-200(A) and its activity staining(B).

2.13, 4.02, 8.34, 10.49 units 이었으며 회수율은 11%이었다(Table 1).

분자량 측정

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 통해 분자량

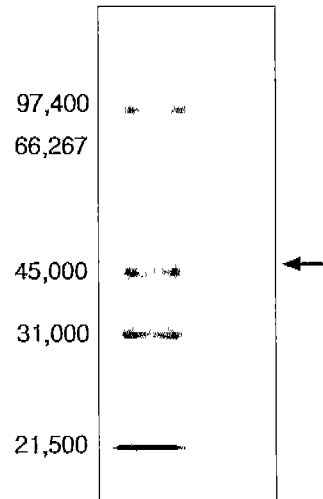


Fig. 3. Estimation of the molecular weight of inulase II by SDS-PAGE.

The arrow indicates the position of DFAase. Standard marker protein are phospholylase b (97,400), serum albumin (66,267), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), trypsin inhibitor (21,500).

을 측정된 결과 Fig. 3에서와 같이 효소의 분자량은 약 45,000 으로 추정되며 이는 *Arthrobacter globiformis*[4]에서의 분자량과 같은 크기이지만 *Arthrobacter* sp. H65-7[16]의 결과인 49,000 과는 약간 차이가 있었다.

효소의 K_m 및 V_{max} 값

Michaelis 상수(K_m)와 V_{max} 값을 inulin의 평균분자량을 5,000 으로 가정하고 농도에 따른 반응속도를 조사한 다음 Lineweaver-Burk plot를 이용하여 구한 결과 효소의 inulin에 대한 K_m 값과 V_{max} 값은 각각 11.9 mM, 3.3 μmol/min/mL 이었다.

최적온도 및 열안정성

생산공정 상에서 효소의 열안정성은 생산과정 동안의 미생물의 증식이나 오염을 막을 수 있으며, inulin의 낮은 용해성(상온에서 7~8%) 때문에 높은 온도가 되어야 상업적 수준(약 20%)의 기질이용이 가능하므로 중요한 요소이다 [3]. 30°C에서 80°C까지의 범위에서 잔류효소활성을 측정된 결과 Fig. 4 에서와 같이 55°C에서 최적의 활성을 나타내었고, 각각의 온도에서 30분과 60분 동안 열처리 한 후 잔

Table 1. Purification steps of inulase from *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity(Units/mg)	Yield (%)
Culture supernatant	54.2	82.1	1.51	100
Ultrafiltration	34.6	73.6	2.13	89.6
(NH ₄) ₂ SO ₄ (60%)	12.4	49.7	4.02	60.6
DEAE-Toyopearl 650M	2.01	16.8	8.34	20.5
Sephadex G-200	0.86	9.0	10.49	11.0

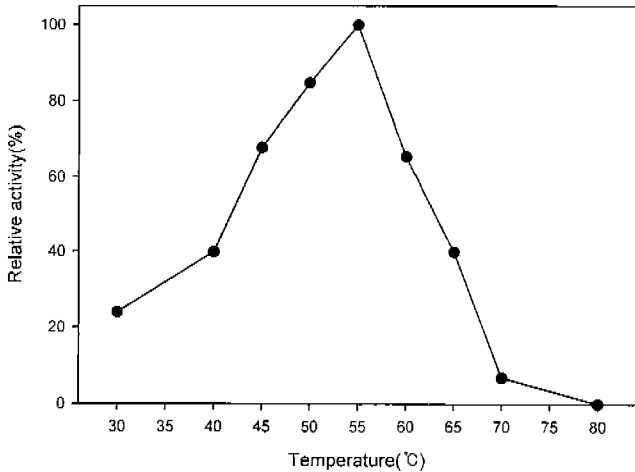


Fig. 4. Effects of temperature on inulase II activity.
The results are relative values to the maximum activity.

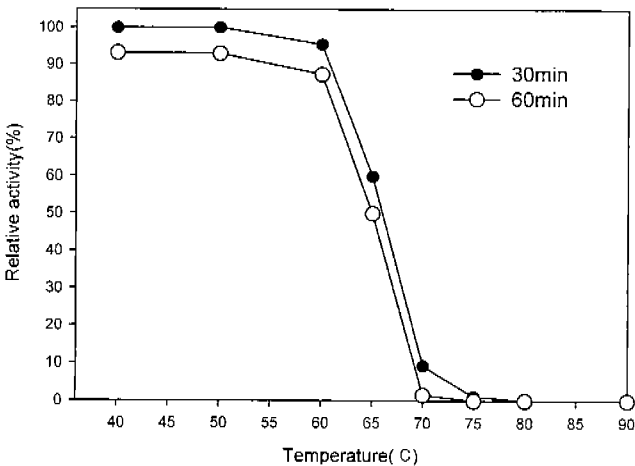


Fig. 5. Effect of temperature on the stability of the enzyme.
Enzyme solution was incubated at indicated temperature for 30 or 60 min. The results are expressed as relative values to the result obtained with non-treated enzyme solution.

류활성을 측정된 결과 Fig. 5 에서와 같이 60°C 이하에서는 90% 이상의 잔류활성을 나타내며 안정하였지만 65°C에서는 급격히 감소하여 잔류활성이 각각 60%와 50%가 되었으며, 70°C에서는 거의 활성을 잃었다.

최적 pH 및 pH 안정성

Fig. 6 에서와 같이 pH 범위 1.0~10.6까지의 효소활성을 측정된 결과 최적 pH는 6.5~7.0 부근으로 나타났으며 사용 완충용액의 종류에 따라 다소의 차이를 보였다. 효소안정성은 37°C에서 1시간 동안 방치하였을 경우 Fig. 7 에서와 같이 pH 범위 4.0~10.6에서는 70% 이상의 활성을 유지하였다.

금속이온의 효과 및 열안정성

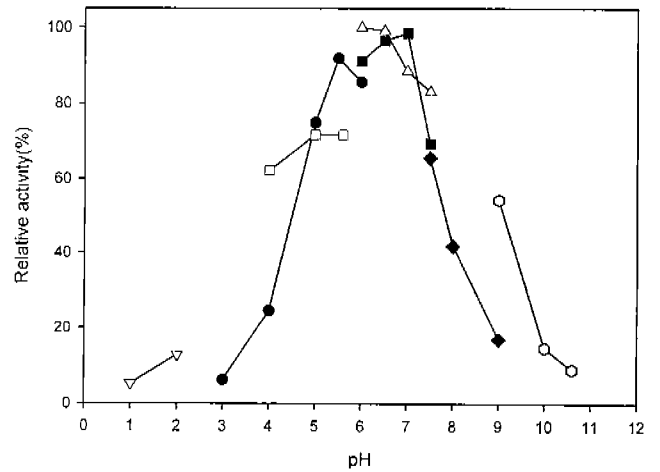


Fig. 6. Effect of pH on inulase II activity.
The following buffer systems were used at a final concentration of 50 mM in the reaction mixture; ▽KCl-HCl buffer; ●citric acid-sodium citrate buffer; □acetate buffer; ■sodium phosphate buffer; △potassium phosphate buffer; ◆Tris-HCl buffer; ○glycine-NaOH buffer. The results are relative values to the maximum activity.

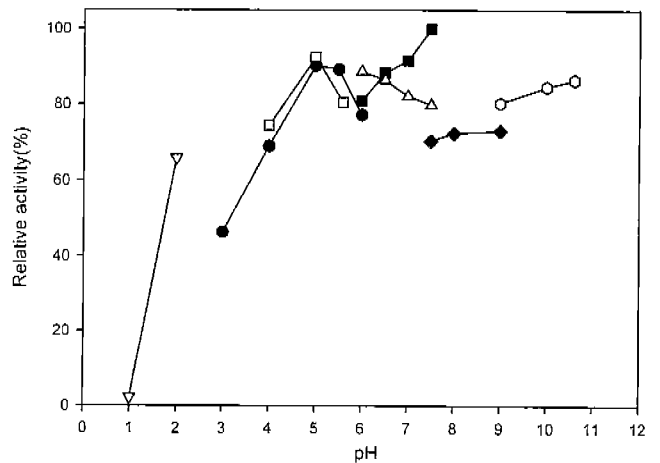


Fig. 7. Effects of pH stability on inulase II activity.
The purified enzyme was concentrated by centricron about 5-fold, and then mixed with the same volume of 0.1M buffer as described below. After incubation at 37°C for 1h, it was used as treated enzyme solution. The enzyme assay was carried out using 20 µl of the treated enzyme solution. The buffer used were as follows; used at a final concentration of 50 mM in the reaction mixture; ▽KCl-HCl buffer; ●citric acid-sodium citrate buffer; □acetate buffer; ■sodium phosphate buffer; △potassium phosphate buffer; ◆Tris-HCl buffer ○glycine-NaOH buffer. The results are expressed as relative values to the result obtained with non-treated enzyme solution.

효소액에 20가지의 금속이온과 chelating agent인 EDTA를 1 mM로 첨가하여 37°C에서 30분간 방치한 후 효소활성을 측정된 결과는 Table 2 와 같다. Hg²⁺에 의해 크게 저해를 받았고 대부분의 금속이온은 효소활성에 거의 영향을 미치지 않았으며 EDTA, DTT, 2-mercaptoethanol 등도

Table 2. Effect of metal ions on inulaseII activity from *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387

Metal ions (added as chloride)	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Ag	1	75
K	1	99
Cs	1	91
Li	1	105
Na	1	91
NH ₄	1	96
Rb	1	104
Ba ²	1	92
Ca ²	1	94
Cd ²	1	89
Co ²	1	90
Cu ²	1	86
Fe ²	1	101
Hg ²	1	43
Mg ²	1	86
Mn ²	1	99
Zn ²	1	90
EDTA	1	100
Dithiothreitol	1	100
2-Mercaptoethanol	1	100
Reference	1	100

Table 3. Effect of metal ions on the stability of inulaseII from *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387

Metal ions (added as chloride)	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Ag	10	7
K	10	79
Cs	10	91
Li	10	77
Na	10	78
NH ₄	10	97
Rb	10	92
Ba ²	10	65
Ca ²	10	90
Cd ²	10	99
Co ²	10	71
Cu ²	10	31
Fe ²	10	27
Hg ²	10	4
Mg ²	10	77
Mn ²	10	76
Zn ²	10	100
EDTA	10	100
Reference	10	100

Enzyme solution was preincubated with each metal ion or chelating agent for 30 min at 37°C. The activity without metal ion or chelating agent is shown as 100%.

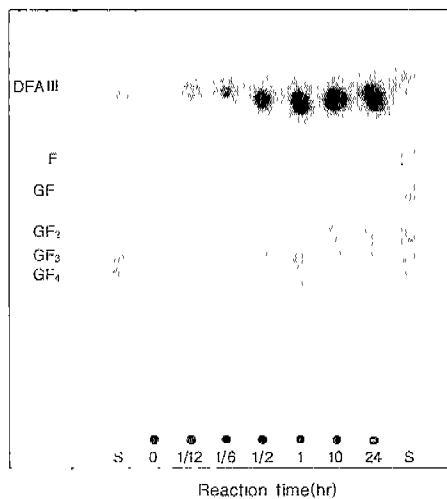


Fig. 8. TLC analysis of the reaction products from inulin with inulaseII.

The enzyme reaction was done at 55°C for the indicated period in a reaction mixture containing 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 5% inulin, 0.1 mL of the purified enzyme (0.08 units) in a total volume of 1 mL.

효소반응을 저해하지 않았다. 그러나 금속이온으로 열처리 한 후의 효소의 활성은 Table 3 에서와 같이 Hg²⁺, Ag⁺에

서 크게 저해를 받았고, Fe²⁺ 와 Hg²⁺ 에 의해 저해를 받는 것으로 나타났다.

반응생산물 분석

Fig. 8 은 정제한 효소를 이용한 inulin 가수분해반응의 반응생성물을 TLC에 의해 반응시간에 따라 분석한 결과로서 반응이 진행됨에 따라 inulin이 감소하고 DFAIII와 oligosaccharide가 형성되었으며 24시간 동안 inulin을 분해한 후의 반응생물은 DFAIII, GF₂ 및 GF₃이었다. 이는 *Arthrobacter* sp. H65-7[16]의 DFAIII, GF₃ 및 GF₄의 결과와 비교된다.

기질특이성

기질에 대한 효소반응은 inulin 대신 levan, fructooligosaccharides(GF₄, GF₃, GF₂의 혼합물), GF₄, GF₃, GF₂, sucrose, DFAIV, fructose 등을 기질로 하여 반응시킨 결과 Fig. 9 에서와 같이 inulin은 DFAIII, GF₂, GF₃, levan은 미량의 DFAIII, fructooligosaccharides는 미량의 sucrose와 DFAIII, GF₄는 GF₂와 DFAIII, GF₃는 sucrose와 DFAIII를 생산하였고, GF₂를 기질로 할 때 DFAIII는 거의 보이지 않았다.

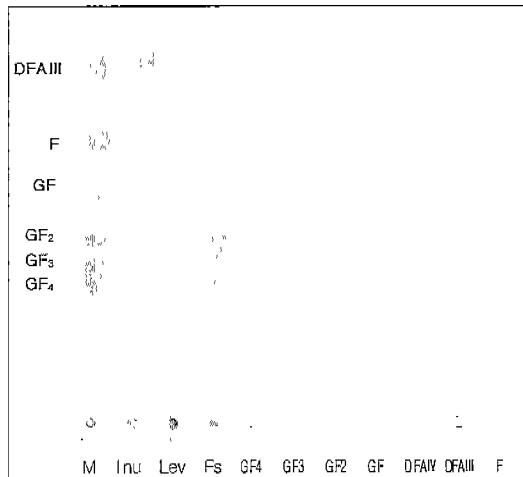


Fig. 9. TLC analysis of the reaction products from various substrates with inulase II.

The enzyme reaction was carried out at 55°C for 24h in a reaction mixture containing 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 1% substrates, 50 μ l of the purified enzyme (0.04 units) in a total volume of 1 ml.

요 약

Arthrobacter ureafaciens KCTC 3387 발효배양상등액으로부터 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전, DEAE-Toyopearl column chromatography, Sephadex G-200 gel filtration에 의하여 exoinulinase(inulase II)를 정제하였으며, 정제된 효소의 비활성은 10.49 units/mg으로, 배양상등액의 7배로 정제되었다. Polyacrylamide gel 전기영동결과 단일 band로 순수하게 분리되었으며 분자량은 45,000으로 추정되었고 Km 값과 V_{max} 값은 각각 11.9 mM, 3.3 μ mol/min/mL 이었다. 효소의 최적반응 pH와 온도는 6.5~7.0, 55°C이었고, pH는 4.0~10.6, 온도는 60°C까지 안정하였다. 대부분의 금속이온은 효소활성에 거의 영향을 미치지 않았으나 Hg^{2+} 이온에 의해 효소활성이 크게 저해를 받았고, 금속이온으로 열처리한 효소의 경우 Ag^+ , Hg^{2+} , Fe^{2+} 와 Hg^{2+} 에 의해 저해를 받았다. Inulin을 24시간 분해한 후의 반응산물은 DFAIII, GF_2 및 GF_3 이었다. 이것은 효소가 GF_2 와 GF_3 를 기질로 이용하지 못함을 나타내는데 반하여 기질에 대한 효소반응결과 GF_3 는 sucrose와 DFAIII를, GF_2 도 미량의 DFAIII를 생산하는 것으로 볼 때 기질에 따른 특성으로 보인다.

감사의 말

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술 연구개발사업 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Baik, B. H., Y. W. Lee, and Y. B. Lcc. 1997. Antianemic agent containing iron and difructose. *US patent No. 5700832*.
- Badford, M. 1976. *Anal. Biochem.* **72**: 248.
- Han, S. B., G. S. Song, H. S. Ryu, M. W. Rho, T. K. Lee, H. S. Sohn, S. J. Woo, and T. B. Uhm. 1991. Purification and properties of *Aspergillus ficuum* exoinlinase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 253-258.
- Haraguchi, K., 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**: 291-292.
- Kang, S. I. and S. I. Kim. 1993. Production of inulin fructotransferase(depolymerizing) from *Enterobacter* sp. S45. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 36-40.
- Kawamura, M., S. Takahashi, and T. Uchiyama. 1988. Purification and some properties of inulin fructotransferase(depolymerizing) from *Arthrobacter ilicis*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 3209-3210.
- Kobayashi, S. 1989. Production and properties of difructose anhydride. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **63**: 1136-1140.
- Laemmlli, U. K. 1970. *Nature* **227**: 680.
- Park, J. B., Y. M. Kwon, and Y. J. Choi. 1995. Production of inulin fructotransferase (depolymerizing) by *Arthrobacter* sp. A-6. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 68-74.
- Sakurai, H., A. Yokota, Y. Sumita, Y. Mori, H. Matsui, and F. Tomita. 1997. Metabolism of DFA III by *Arthrobacter* sp. H65-7: Purification and properties of a DFA III hydrolysis enzyme(DFA IIIase). *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 989-993.
- 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*. *Biochem. Biophys. Acta* **284**: 248-256.
- Tanaka, T., T. Uchiyama, H. Kobori, and T. Tanaka. 1975. Enzyme hydrolysis of di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride with *Arthrobacter ureafaciens*. *J. Biochem.* **78**: 1201-1206.
- Uchiyama, T., S. Niwa, and K. Tanaka. 1973. Purification and properties of *Arthrobacter ureafaciens* Inulinase II. *Biochemica et Biophysica Acta* **315**: 412-420.
- Uchiyama, T. 1975. Action of *Arthrobacter ureafaciens* inulinase II on several oligofructans and bacterial levans. *Biochemica et Biophysica Acta* **397**: 153-163.
- Yokota, A., K. Enomoto, and F. Tomita. 1991. Purification and properties of an inulin fructotransferase(depolymerizing) from *Arthrobacter* sp. H65-7. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 262-265.
- Yokota, A., S. Hirayama, K. Enomoto, Y. Miura, S. Takao, and F. Tomita. 1991. Production of inulin fructotransferase(depolymerizing) from *Arthrobacter* sp. H65-7 and preparation of DFA III from inulin by the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 258-261.

(Received July 29, 1999)