

Exo-inulinase 생산 균주의 분리·동정 및 효소 생산의 최적화

김병우·이경희^{†*}

동의대학교 미생물학과

*부산대학교 약학과

Isolation and Identification of Exo-Inulinase Producing Bacterium and Optimization of the Enzyme Production

Byung-Woo Kim and Kyung-Hee Lee^{†*}

Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

*Department of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

A bacterium producing exo-inulinase was isolated from soil and identified *Pseudomonas* sp. and named as *Pseudomonas* sp. NO5. The optimal culture conditions for the efficient production of exo-inulinase from *Pseudomonas* sp. NO5 were obtained by cultivating with the medium 1% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.5% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.001% and FeSO₄ · 7H₂O at 37°C in initial pH 7.0 for 20 hours. The enzyme was induced maximally in the presence of sucrose or inulin at early stationary phase about 20 hour after cultivation.

Key words : Inulinase, isolation, *Pseudomonas*, Optimization of enzyme production

서 론

Inulin은 돼지감자(Jerusalem artichoke), 치커리(Chicory), 다알리아(Dahlia) 등의 국화과(Compositae) 식물의 구근에 함유된 polyfructan으로 30-35개의 fructose가 β -2,1결합에 의해 직쇄상으로 연결되어 있고 그 말단에 D-glucose가 α -1,2결합을 하고 있다[6]. 돼지감자는 기후와 토양에 대한 적응력과 번식력, 내병성 및 내충성이 강하고 단위 면적 당 수확량도 많아서 우리 나라에서 재배하기가 용이한 식물일뿐 아니라, inulin 가수분해에 의해 75%이상의 fructose를 생산 할 수 있다고 보고되어 있어 감미

자원이 부족한 우리 나라에서는 매우 유망한 감미 자원으로 활용할 수 있다[1].

Inulinase는 inulin 분해효소로서 작용 기작의 차이에 따라 크게 두 가지로 분류된다. 첫째는 β -D-fructofuranosidase(EC 3.2.1.26, 2,1- β -D-fuctan fructohydrolase)로 inulin뿐만 아니라 sucrose도 분해하는 효소로 inulin의 말단으로부터 β -2,1결합을 fructose단위로 가수분해하는 exo형 inulinase이다. *Kluyveromyces fragilis*[14]를 비롯한 대부분의 효모와 *Aspergillus niger*[16]등의 곰팡이 및 *Bacillus subtilis*[17]등 대부분의 미생물이 생산하는 inulinase가 여기에 속한다. 둘째는 2,1- β -D-fuctan fructanohydrolase(EC

[†] Corresponding author

3.2.1.7)로서 inulin은 분해나 sucrose 분해능은 없는 효소로 inulin 내부의 β -2,1 결합을 가수분해하여 저분자의 fructooligo당을 생성시키는 endo형 inulinase 이다. 식물에서 얻어질 수 있는 대부분의 inulinase[2] *Aspergillus niger*[9], *Streptomyces chibaensis*[5] 및 *Pseudomonas* sp.[7]등 극히 일부 미생물에 의해서 생산되는 것으로 보고되어 있다.

한편 fructose는 감미료로서 다른 당보다 충치 발생률이 낮고 insulin 비 의존성으로 당뇨병자에 좋을 뿐 아니라, ethanol대사를 촉진하고 철의 장 흡수를 돕는 등 감미료로서의 활용가치가 대단히 높다. Fructose의 공업적 생산은 지금까지 포도당을 glucose isomerase로 이성화시켜 생산하고 있으나 최근에는 값싼 원료 기질인 inulin을 이용하여 과당시럽을 생산하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. Inulin을 이용한 과당시럽 생산 방법에는 inulin을 화학적으로 산 가수분해하여 fructose를 얻을 수 있으나 많은 양의 산과 에너지가 필요하며 얻어진 syrup은 부식성의 맛과 냄새를 낼 뿐 아니라, 생산된 시럽이 caramelization화에 의해 갈변하고, 광산을 사용하고 중화하면서 생길 mineral성분이 생성물에 혼합되어 있어 정제공정 단계를 방해하는 등 여러 가지 문제점을 갖고 있다. 따라서 화학분해의 단점을 개선하고자 inulinase를 이용한 생물학적 분해에 관한 연구가 주목받고 있다.

본 연구에서는 값싼 원료기질인 inulin을 이용한 과당시럽 생산을 위해 inulin 가수분해 효소 중 exo형 inulinase를 생산하는 미생물을 토양으로부터 순수 분리하여 동정하고 탄소원, 질소원을 비롯한 각종 영양 성분과 배양조건이 효소생산에 미치는 영향을 조사하여 효소생산의 최적화 조건을 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

Inulinase 생산 균주의 분리

토양 샘플을 분리용 기본배지(1% inulin, 0.2% peptone, 0.5% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.05% KCl, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 5 ml에 가하여 37°C에서 24시간 진탕 배양한 다음 희석평판법을 이용하여 탄소원으로 inulin을 이용하는 균주를 분리하였다.

Inulin분해 활성확인

분리된 균주는 TTC염색법[11]으로 inulin분해능을 확인

하였다. TTC염색법은 상기 기본 배지에 분리 균주를 접종하여 37°C, 24시간 배양한 다음 생성된 colony를 1% tetrastazolium(0.2M phosphate buffer, pH7.0)용액을 추가하여 발색시킨 다음 inulin이 분해되어 생성된 환원당에 의해 붉은색의 halo를 나타내는 균주를 inulinase 생산 균주로 판정하고 선별하였다.

Inulinase 활성의 측정

효소의 활성 측정은 2.0% inulin이 함유된 50mM phosphate buffer (pH 6.0) 100 μl 에 조효소액 100 μl 를 넣고, 37°C 2시간 반응시킨 후 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson법[12]으로 정량하였다. 효소 1 unit는 위의 조건에서 fructose를 표준으로하여 분당 1 μmol 의 fructose를 생성하는 효소량으로 하였다.

당정량

총 당량의 측정은 시료에 1N HCl을 첨가하여 100°C에서 1시간 가수분해시킨 다음 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson법¹¹⁾으로 정량하였으며, 환원당량은 가수분해 과정을 거치지 않고 Somogyi-Nelson법으로 정량하였다.

Paper Chromatography

효소의 반응 생성물은 paper chromatography로 확인하였다. 2% inulin이 함유된 50mM phosphate buffer (pH 6.0) 100 μl 에 조효소액 100 μl 를 넣고 37°C에서 24시간 반응시킨 후 반응액 20 μl 를 Toyo filter No. 50이나 Whatman No. 1 filter paper에 적정한 후 60°C에서 상층법으로 3회 다중 전개시켰다. 전개용매는 n-butanol, pyridine, H_2O (6 : 4 : 3 v/v)를 사용하였다. 전개 후 발색은 silver nitrate법[15]으로 하였다.

당표준물질은 glucose(G_1), maltose(G_2), maltotriose (G_3), maltotetraose(G_4), maltopentaose(G_5), maltohexaose (G_6), maltoheptaose(G_7), maltooctaose(G_8)를 사용하였으며, 모두 sigma사 제품을 사용하였다.

분리균주의 동정

분리균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[13]와 Methods for Genetic and Molecular Bacteriology[3]의 방법에 따라 동정하였다.

결과 및 고찰

Inulinase 생산균의 분리

경남일원의 돼지감자 서식지 부근에서 채취한 토양 1g을 분리용 기본배지 20 ml에 접종하고 37°C에서 3일간 진탕 배양하여 증식시켰다. 증식된 균을 분리용 고체배지에 도말하고 1일간 배양하여 생성되는 colony를 TTC 염색법으로 inulin 분해능을 검토하고 halo를 나타내는 균주를 다시 분리용 고체배지에 replica하여 단일 colony를 분리시켰다. 분리된 균주를 분리용 기본액체배지에 접종하고 37°C에서 20시간 진탕 배양한 후, 원심 분리하여 이때의 상등액을 조효소액으로 하여 2% inulin을 포함하는 50mM 인산완충액을 조효소액과 반응시키고, 생성되는 환원당을 paper chromatography로 분석하였다. 분리된 균주 중 paper chromatography상에서 fructose만을 생산하는 균주를 exo형 inulinase 생산 균주로 판단하고 fructose 생산능이 우수한 균주를 최종 선별하여 본 실험에 공시 균주로 사용하였다.

분리균주의 동정

분리균주의 형태학적 특징은 0.5×2 μm 크기의 호기성, Gram 음성 간균으로 운동성이 있으며 polar flagella를 가지고 분리용 기본고체배지에서의 colony는 흰색이었다. 생리·생화학적 특성은 glucose, arabinose, xylose, fructose와 같은 당을 발효하여 산을 생성시키며, casein과 전분 분해능이 없으며, 밝은 적색의 수용성 형광색소를 생산하고, TSI 배지에서 H₂S를 생성하지 않고 indole을 생성하지 않았다. 최적 배양 pH와 온도는 각각 pH 7.0과 37°C이었다. 그 외의 생리 생화학적 특성은 Table 1과 같다. 분리균주의 이와 같은 특징은 *Pseudomonas*속 균주의 특징적인 형태 및 생리적 특성을 나타내고 있어 분리균주를 *Pseudomonas* sp.로 동정하고 *Pseudomonas* sp. NO5로 명명하였다.

inulinase 생산을 위한 배양조건 최적화

탄소원의 영향

기본배지에 각종 탄소원 1%를 첨가하여 inulinase 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과 Table 2와 같이 sucrose, inulin, lactose의 순으로 높은 효소 생산성을 보이며, soluble starch, fructose, glucose, galactose, maltose

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of strain NO5

Characteristics	Isolated strain No. 5
1. Morphological properties	
Type and size	Rod, 0.5×2μm
Gram staining	Negative
Colonies on agar plate	Circular with edged margin creamy white
Motility	+
Flagellar	+
Spore	-
2. Biochemical properties	
Production of acid on glucose, arabinose, xylose and fructose	No gas, all acid formation
Oxidative/Fermentation on Hugh & Leifson's medium	Oxidative
Methanol and ethanol fermentation	-
Growth at pH 4	-
Catalase	+
Oxidase	+
Growth at 4.5% NaCl	-
Gelatin hydrolysis	-
Casein and starch hydrolysis	-
Nitrate reduction	-
Litmus milk reaction	+
Fluorescent pigment (water soluble)	Bright red
H ₂ S on Triple Sugar Iron Agar (Red slant & trf butt)	-
Indole	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-

나 탄소원으로 inulin을 첨가하였을 때 보다 sucrose를 첨가하였을 때 균체의 증식(OD₆₆₀ 11.63) 뿐 아니라 효소 생산량도 3.5 U/ml(비활성 1.42 U/mg)로 현저히 높아서 NO5 균주에 의한 inulinase 생산은 sucrose등의 유도기질이 존재할 때 유도됨을 알 수 있었다. 따라서 본 분리 균주의 inulinase 생산은 구성효소로 보고되고 있는 *B. subtilis*[16]나 *Aspergillus niger*[9]와는 전혀 다르고 inulin에

Table 2. Effect of carbon sources on production of inulinase by strain NO5

Carbon sources (1%)	Cell growth (OD ₆₆₀)	Inulinase activity (U/ml)	pH	Protein(mg/ml)	Specific activity (U/mg)
Inulin	4.19	0.66	7.40	1.43	0.46
Soluble starch	6.36	0	7.33	1.41	0
Lactose	3.91	0.60	7.59	1.68	0.36
Sucrose	11.63	3.50	5.64	2.46	1.42
Fructose	6.40	0	7.09	2.21	0
Galactose	5.71	0	7.19	2.35	0
Glucose	7.87	0	6.90	2.17	0
Maltose	6.88	0	7.13	1.50	0
Glycerol	6.97	0	7.12	1.82	0

*Cultivation was carried out for 20hr at 37°C in basal medium containing 0.2% peptone, 0.8% NH₄H₂PO₄, 0.4% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, and 0.001% FeSO₄ · 7H₂O with initial pH 7.0.

의해 inulinase을 유도 생산되면서 sucrose에 의해서도 상당히 높은 유도효과를 나타내는 inulinase 생산 균주 *K. fragilis*[4]와 비슷한 양상을 나타내었다.

한편 sucrose 농도에 따른 효소 생산량의 차이를 살펴본 결과(Table 3) sucrose 1% 농도에서 3.31 U/ml(비활성 1.37 U/mg)로 효소 생산량이 가장 많았으며 그 이상의 농도에서는 균체 증식량과 효소 생산량이 1%와 비슷하였다.

따라서 NO5 균주에 의한 inulinase 생산의 최적 탄소원은 sucrose 1%로 결정 하였다.

질소원의 영향

각종 질소원을 유기 및 무기로 분류하여 inulinase 생산에 미치는 효과를 조사 해 본 결과 Table 4에 나타난 것처럼 유기 질소원으로 0.5% yeast extract를 첨가하였을 때

Table 3. Effect of sucrose concentrations on production of inulinase by strain NO5

Sucrose concentration (%)	Cell growth (OD ₆₆₀)	pH	Inulinase (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
0.50	8.92	6.05	2.39	1.92	1.24
1.00	10.65	5.64	3.31	2.40	1.37
1.50	11.20	5.53	3.45	2.55	1.35
2.00	10.75	5.60	3.44	3.30	1.04

*Cultivation was carried out for 20 hr at 37°C in basal medium containing 0.2% peptone, 0.8% NH₄H₂PO₄, 0.4% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, and 0.001% FeSO₄ · 7H₂O with initial pH 7.0.

Table 4. Effect of organic nitrogen sources on production of inulinase by strain NO5

Organic nitrogen sources (0.5%)	Cell growth (OD ₆₆₀)	pH	Inulinase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
Beef extract	2.18	6.94	3.08	2.13	1.45
Peptone	2.66	6.88	2.26	2.29	0.99
Corn steep liquor	11.12	6.70	3.13	2.22	1.41
Yeast extract	3.60	6.93	4.06	2.36	1.72
Trypton	9.60	6.73	3.52	2.07	1.70

*Cultivation was carried out for 20hrs at 37°C in basal medium containing 1% sucrose, 0.8% NH₄H₂PO₄, 0.4% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, and 0.001% FeSO₄ · 7H₂O with initial pH 7.0.

균체의 성장은 corn steep liquor(CSL)나 tryptone을 첨가하였을 때 보다 현저히 낮았으나 효소생산은 상대적으로 높았다(4.06 U/ml). 이와 같은 결과는 Nakamura등[9]이 보고한 *Penicillium*속 균주나 Lee등[8]이 보고한 *Pseudomonas*속 균주의 inulinase 생산에는 CSL이 효과적이라는 연구 결과와는 상이하였다. 한편 무기질소원이 효소생산에 미치는 영향은 Table 5에 나타내었으며 무기질소원의 첨가가 첨가하지 않은 대조구에 비해 효소 생산량이 약간 증가하였으나 큰 차이는 없었고 그중에서 0.5% (NH₄)₂HPO₄를 첨가하였을 때 효소생산량이 1.2배 가량 증가함을 알 수 있었다. 이상의 결과로 본 분리균주 NO5의 inulinase생산 최적질소원으로는 0.5% yeast extract와 0.5% (NH₄)₂HPO₄로 결정하였다.

금속이온의 효과

Inulinase 생산에 가장 좋은 효과를 나타내었던 무기 및

유기 질소원을 최적 농도로 첨가한 기본배지에 각종 금속염을 첨가하여, 37℃에서 20시간 진탕 배양한 결과(Table 6), 0.05% MgSO₄ · 7H₂O와 0.001% FeSO₄ · 7H₂O를 첨가하였을 때 첨가하지 않은 대조구에 비해 각각 약 2배 이상 효소 생산이 증가되었다.

따라서 이상의 결과로 분리균주 NO5의 효소생산 최적 배지 조성은 1% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.5% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.001% FeSO₄ · 7H₂O로 결정하였다.

pH 및 배양 온도의 영향

분리균주를 최적 생산배지에서 배양할 때 배양액의 pH나 배양 온도 등의 배양조건이 효소 생산과 균체 증식에 미치는 영향을 검토한 결과(Table 7, 8) 분리균주는 배지의 pH에 매우 민감하여 초기 pH에 따라 세포 증식속도와 효소 생산량이 큰 차이를 나타내었으며 세포 증식과 효소

Table 5. Effect of inorganic nitrogen sources on production of inulinase by strain NO5

Inorganic nitrogen sources (0.5%)	Cell growth (OD ₆₆₀)	pH	Inulinase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
Control	3.17	6.65	3.88	2.18	1.78
NH ₄ Cl	3.53	6.52	3.92	2.25	1.74
NH ₄ NO ₃	3.28	6.66	4.12	2.56	1.61
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.23	6.37	4.03	2.30	1.75
NH ₄ H ₂ PO ₄	3.53	6.48	4.09	2.22	1.84
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.75	6.53	4.69	2.27	2.07
KNO ₃	3.63	6.78	4.24	2.11	2.01
NaNO ₃	2.95	6.70	3.21	2.12	1.51

*Cultivation was carried out for 20hrs at 37℃ in basal medium containing 1% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, and 0.001% FeSO₄ · 7H₂O with initial pH 7.0.

Table 6. Effect of metal ions on production of inulinase by strain NO5

Metal ion (%)	Cell growth (OD ₆₆₀)	pH	Inulinase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
Control	4.25	6.16	2.06	1.84	1.12
KCl(0.05)	3.95	6.32	1.99	1.53	1.30
MgSO ₄ (0.05)	4.57	5.92	4.30	1.84	2.34
CaCl ₂ (0.05)	4.46	6.46	3.60	1.96	1.87
FeSO ₄ (0.001)	4.35	6.71	4.31	1.64	2.68

*Cultivation was carried out for 20hrs at 37℃ in basal medium containing 1% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.5% (NH₄)₂HPO₄, with initial pH 7.0.

Table 7. Effect of initial pH on production of inulinase by strain NO5

pH	Cell growth (OD ₆₆₀)	Inulinase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
5.5	0.56	0.28	0.56	0.50
6.0	2.07	1.24	1.53	0.81
6.5	4.68	2.85	1.95	1.46
7.0	5.52	4.60	2.67	1.72
7.5	5.55	4.40	2.64	1.67
8.0	5.34	3.65	2.55	1.43

*Cultivation was carried out for 20 hrs at 37°C in basal medium containing 1% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.5% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, and 0.001% FeSO₄ · 7H₂O at each pH.

Table 8. Effect of temperature on production of inulinase by strain NO5

Temperature (°C)	Cell growth (OD ₆₆₀)	Inulinase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
30	1.09	1.18	1.14	1.04
37	4.78	4.12	2.55	1.62
45	3.25	1.60	0.95	1.68
50	0.23	0.11	0.21	0.52
55	0.25	0.09	0.21	0.43

*Cultivation was carried out for 20hrs at each temperature in basal medium containing 1% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.5% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, and 0.001% FeSO₄ · 7H₂O with initial pH 7.0.

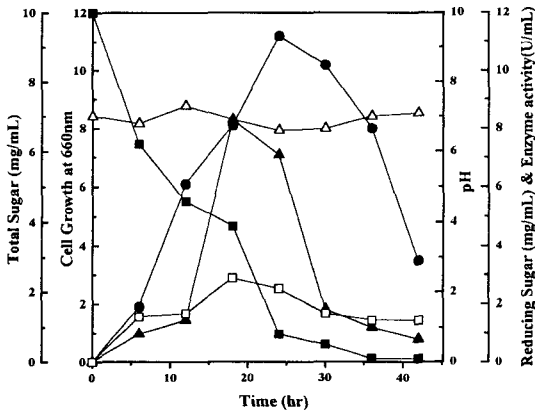


Fig. 1. Time course of the cell growth, pH change and extracellular production on inulinase.

Symbols: ●, cell growth; △, pH; ■, total sugar; ▲, reducing sugar; □, inulinase activity.

생산량 모두 배지 초기 pH가 7.0에서 배양할 때 가장 높았다. 또 Table 8에서와 같이 배양온도 역시 37°C에서 각각 최고의 생육과 최고의 효소 생산량을 나타내었다.

배양시간에 따른 효소 생산

효소 생산 최적 배지에서 1% sucrose대신 1% inulin을 첨가하여 최적 배양 조건에서 분리 균주를 삼각 flask로 batch 배양하면서 시간에 따라 균체의 증식과 효소생산량, pH의 변화, inulin분해도 및 배지중의 환원당량을 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 배양후 20시간에 균체 증식이 최대치를 나타내었으며 inulinase 생산 역시 균체 증식이 최대에 이르렀을 때 가장 활성이 높았다. 이에 따른 배지중의 inulin은 배양 20시간후 거의 분해되어 약 95%정도 소모되었으며 환원당량은 점차 증가되어 배양 20시간에 최대가 되었다. 따라서 본 연구 결과, *Pseudomonas*속으로 동정된 토양 분리균은 탄소원으로 inulin이 존재할 때 이를 분해하여 에너지원으로 이용하기 위하여 inulinase를 유도 생산하는 것으로 판명되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1997년도 부산대학교 학술연구조성비의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Chabbert, N., Braun, P., Guiraud, J.P., Arnoux, M. and Galzy, P. 1983. Productivity and fermentability of Jerusalem artichoke according to harvesting date. *Biomass*, **3**, 209.
2. Edelman, J. and Jeffered, T. G. 1964. The methabolism fo fructose polymers in plants. *Biochem. J.*, **93**, 148.
3. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. and Krieg, N. R. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. ASM, Washington, D.C.
4. Groot Wassink, J. W. D. and Hewitt, G. M. 1983. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 31.
5. Ha, Y. J., Choi, E. H. and Kim, S. I. 1989. Production od endo-type inulinase from *Streptomyces* sp. S56. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 593.
6. Hirst, E. L., Mcgilvray, D. J. and Percival, E. G. V. 1950. Studies on fructosans. *J. Chem. Soc.*, **72**, 1279.
7. Lee, T. K., Shin, H. C. Choi, Y. J. and Yang, H. C. 1988. Characteristics of extracellular endo inulinase produced by *Pseudomonas* sp.. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 484.
8. Lee, T. K., Sung, H. C., Choi, Y. J. and Yang, H. C. 1987. Culture condition for inulinase production by *Pseudomonas* species. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 176.
9. Nakamura, T., Kurokawa, S., Nakatsu, S. and Ueda, S. 1978. Crystallization and general properties of an extracellular inulinase from *Aspergillus* sp., *Nippon Nogeikagaku kaishi*, **52**, 159.
10. Nakamura, T., Maruki, S., Nakatsu, S. and Ueda, S. 1978. General properties of an extracellular inulinase (p-II) from *Aspergillus* sp.. *Nippon Nogeikagaku kaishi*, **52**, 159.
11. Nam, S. W., Yoda, K. and Yamasaki, M. 1993. Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*, **15**, 1049.
12. Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375.
13. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, Williams and Wilkins, Baltimore.
14. Snyder, H. E. and Phaff, H. J. 1960. Studies on a β -fructosidase produced by *Saccharomyces fragilis*. *Anthonie van Leeuwenhoek*, **26**, 433.
15. Trevelyan, W. E., Procter, D. P. and Harison, J. S. 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, **166**, 441.
16. Uhm, T. B., Hong, J. S. Sohn, H. S., Park, M. K. and Byun, S. M. 1985. Production of fructose from jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. *J. Food Sci.*, **43**, 1871.
17. Uhm, T. B., Hong, J. S., Sohn, H. S., Park, M. K. and Byun, S. M. 1985. A constitutive inulinase from a *Bacillus*. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, **28**, 131.